

**EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE DESINFECCIÓN DE AGUA POR LÁSER
INFRARROJO USANDO *ESCHERICHIA COLI* COMO BIOINDICADOR**

FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ PULIDO

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C
2017**

**EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE DESINFECCIÓN DE AGUA POR LÁSER
INFRARROJO USANDO *ESCHERICHIA COLI* COMO BIOINDICADOR**

FRANCISCO JAVIER SÁNCHEZ PULIDO

**Proyecto integral de grado para optar el título de
INGENIERO QUÍMICO**

**Orientador
Oscar Libardo Lombana
Ingeniero Químico**

**FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA
FACULTAD DE INGENIERÍAS
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
BOGOTÁ, D.C
2017**

Nota de aceptación:

Ingeniero Oscar Libardo Lombana
Presidente del Jurado

Ingeniero Edgar Fernando M.

Ingeniero Juan Camilo Cely

Bogotá D.C, agosto de 2017

DIRECTIVAS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro

Dr. Jaime Posada Díaz

Vicerrector de Desarrollo y Recursos Humanos

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Posgrados

Dra. Ana Josefa Herrera Vargas

Secretario General

Dr. Juan Carlos Posada García-Peña

Decano de Facultad de Ingeniería

Ing. Julio Cesar Cifuentes Arismendi

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Leonardo de Jesús Herrera Gutiérrez

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables por los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente al autor.

AGRADECIMIENTOS

En la realización del presente trabajo fue mucho el apoyo recibido sin el cual difícilmente hubiese podido lograr los resultados que hoy expongo. Mis agradecimientos van dirigidos fundamentalmente a:

La Ingeniera Diana Marcela Cuesta, Directora del trabajo de grado por la dedicación y las orientaciones recibidas.

Al orientador del proyecto, Ingeniero Oscar Lombana, quien me guió y asesoró desde el comienzo de este trabajo, su ayuda fue fundamental para la finalización de este proyecto.

A la empresa Laser Nao por permitirme utilizar la tecnología láser y por el apoyo técnico recibido durante todo el proceso.

A la Doctora Myriam Amparo Pulido Rozo quién me brindo desinteresadamente ayuda en todo lo relacionado con el tema del láser infrarrojo y su tecnología.

A la Doctora Rosa Baldiris Ávila de la Universidad de Cartagena quien me abrió las puertas para poder realizar los experimentos en los laboratorios de dicha institución.

Al Biólogo Alfredo Montes de la Universidad de Cartagena quien me acompañó durante todo el desarrollo de los experimentos y de quien recibí el conocimiento y la experticia para la realización de cada una de las fases de la experimentación.

A mis padres, familia y amigos que estuvieron ahí apoyándome para poder culminar con este proyecto.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado especialmente a mis padres, quienes han creído en mí en todo momento y me han apoyado incondicionalmente en todo lo que he hecho. Dedicado también a la ingeniera Laura Benavides Largo quien me apoyo y asesoró desinteresadamente para que pudiese culminar este proyecto de la mejor manera, a mis amigos más cercanos que en todo momento fueron mi aliento para que siguiera adelante con esto y muy especialmente dedicado a mi amiga y novia Valentina Sanjuan Gómez que estuvo conmigo en todo momento, desde que inicie con este proyecto, apoyándome, alentándome, pero sobre todo sacando siempre lo mejor de mí porque ella nunca dudo de mis capacidades y siempre ha creído en mí, a ella mil y mil gracias porque fue esa voz de aliento, ese soporte incondicional en los momentos que más lo necesité.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	
OBJETIVOS	21
1. GENERALIDADES	22
1.1 EL AGUA	22
1.2 DESINFECCIÓN DEL AGUA PARA CONSUMO HUMANO	23
1.3 METODOS QUÍMICOS	23
1.3.1 Cloración	23
1.3.2 Ozonización	24
1.4 METODOS FÍSICOS	25
1.5 LA LUZ LÁSER	26
1.5.1 Características de la luz láser	27
1.5.2 Láseres según medio activo	29
1.5.3 Láseres según su potencia	29
1.5.4 Espectro electromagnético	31
1.6 ESCHERICHIA COLI	32
1.6.1 E.coli enterotoxigénica	33
1.6.2 E.coli enteropatógena	33
1.6.3 E.coli enterohemorrágica	33
1.6.4 E.coli enteroinvasiva	33
1.6.5 E.coli enteroagregativa	33
1.7 VARIABLES PARA EL ANÁLISIS DE DESINFECCIÓN DE AGUA	34
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	35
2.1 METODOLOGÍA	35
2.1.1 Planteamiento del problema	35
2.1.2 Diseño experimental	35
2.2 IDENTIFICACIÓN DE E. COLI	36
2.2.1 Agar MacConkey	36
2.2.2 Agar EMB	36
2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	37
2.3.1 Preparación de tubos con bacteriano	37
2.3.2 Estandarización de la concentración	37
2.4 MONTAJE DE MUESTRAS CON BACTERIA	39
2.5 LECTURA INICIAL DENSIDAD OPTICA	40
2.6 INDICENCIA DEL LÁSER INFRARROJO	42
2.7 MONTAJE EXPERIMENTAL	42
2.8 LECTURA FINAL DENSIDAD OPTICA	43
2.9 EQUIPOS	43
2.9.1 Láser infrarrojo	43
2.9.2 Autoclave	44
2.9.3 Horno de secado	45

2.9.4 Incubadora	45
2.9.5 Agitador vórtex	46
2.9.6 Balanza analítica	46
2.10 MATERIALES	47
2.11 REACTIVOS	47
2.11.1 Agar Mueller Hinton	47
2.11.2 Caldo Mueller Hinton	47
2.11.3 Agar MacConkey	48
2.11.4 Agar EMB	49
2.12 CEPAS	49
2.12.1 Cepa comercial	49
2.12.2 Cepa clínica	49
2.12.3 Cepa de alimento	49
 3. ANÁLISIS Y RESULTADOS	 50
3.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS CEPA ATCC 25922	50
3.2 ANALISIS DE RESULTADO CEPA CLÍNICA Y ALIMENTOS	52
3.3 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO CEPA CLÍNICA	52
3.3.1 Primera Réplica	52
3.3.2 Segunda Réplica	55
3.3.3 Tercera Réplica	57
3.4 PROMEDIO DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA CLÍNICA	59
3.5 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA DE ALIMENTOS	61
3.5.1 Primera Réplica	61
3.5.2 Segunda Réplica	63
3.5.3 Tercera Réplica	65
3.6 PROMEDIO RESULTADOS CEPA DE ALIMENTOS	67
3.7 INFLUENCIA DE LAS VARIABLES TIEMPO Y POTENCIA	68
3.8 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)	69
 4. COSTOS	 74
 5. CONCLUSIONES	 75
 6. RECOMENDACIONES	 76
 BIBLIOGRAFÍA	 77
 ANEXOS	 79

INDICE DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Efectos del láser sobre el tejido a diferentes temperaturas	32
Tabla 2. Distribución de los tubos de ensayo con inóculo Bacteriano a diferente concentración	40
Tabla 3. Disposición en la microplaca de las muestras tomadas de los tubos con bacteria a potencias y tiempos diferentes para concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 bacterias/mL	41
Tabla 4. Recolección de datos para potencias de 4 watts y tiempos de 30,90 y 180 segundos	41
Tabla 5. Recolección de datos para potencias de 7 watts y tiempos de 30,90 y 180 segundos	42
Tabla 6. Recolección de datos para potencias de 10 watts y tiempos de 30,90 y 180 segundos	42
Tabla 7. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para la cepa ATCC 25922 para la primera prueba experimental en el laboratorio	50
Tabla 8. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos.	52
Tabla 9. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a Células/mL.	53
Tabla 10. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas.	55
Tabla 11. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, segunda réplica.	55
Tabla 12. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a células/mL, segunda réplica.	56
Tabla 13. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas, segunda réplica.	57
Tabla 14. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, tercera réplica.	57
Tabla 15. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a células/mL, tercera réplica	58
Tabla 16. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas, tercera réplica	59
Tabla 17. Promedios de concentraciones finales para la cepa clínica	60
Tabla 18. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos.	61
Tabla 19. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a Células/mL	61

Tabla 20. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas	63
Tabla 21. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, segunda réplica.	63
Tabla 22. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a Células/mL. Segunda replica.	64
Tabla 23. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas. Segunda replica cepa de alimentos	65
Tabla 24. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, tercera réplica.	65
Tabla 25. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a células/mL. Tercera replica cepa alimentos.	66
Tabla 26. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas, tercera replica cepa de alimentos	67
Tabla 27. Promedios concentraciones finales cepa de alimentos	67
Tabla 28. Diseño factorial para la viabilidad de la <i>Escherichia coli</i> cepa clínica.	69
Tabla 29. Diseño factorial para la viabilidad de la <i>Escherichia coli</i> cepa alimentos.	69
Tabla 30. Análisis ANOVA para la cepa clínica	70
Tabla 31. Análisis ANOVA para la cepa de alimentos	71
Tabla 32. Costos detallados del experimento	73

INDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Sistema de desinfección de agua por cloro gaseoso	24
Figura 2. Lámpara de UV mostrando detalles en A y con la cubierta protectora del sistema B	26
Figura 3. Diferencia entre luz normal y luz láser	28
Figura 4. Espectro electromagnético de luz visible	31

INDICE DE GRÁFICAS

	pág.
Gráfica 1. Grafica de crecimiento bacteriano entre la concentración inicial y la concentración final en cada una de las muestras	51
Grafica 2. Comparación entre la concentración inicial y final para la 1ra réplica a 7 y 10 Watts	54
Grafica 3 Comparación entre concentración inicial y final para la 2da replica a 7 y 10 Watts	56
Grafica 4. Comparación entre concentración inicial y final para la 3ra replica a 7 y 10 Watts	58
Grafica 5. Promedio de concentraciones finales cepa clínica	60
Gráfica 6. Comparación concentración inicial y final 1ra replica cepa alimentos a 7 y 10 watts	62
Grafica 7. Comparación concentración inicial y final 2da replica cepa alimentos a 7 y 10 watts	64
Gráfica 8. Comparación concentración inicial vs final 3ra replica cepa alimentos a 7 y 10 watts	66
Gráfica 9. Promedio de concentraciones finales cepa alimentos.	68

INDICE DE IMAGENES

	pág.
Imagen 1. Crecimiento de cepas <i>E.coli</i> en agar MacConkey.	36
Imagen 2. Crecimiento de cepas <i>E.coli</i> en agar EMB.	37
Imagen 3. Tubos de ensayo con las concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 bacterias/mL	38
Imagen 4. Gradilla con los tubos de ensayo con inóculo de bacteria a concentración de 1×10^7 y 1×10^8 bacterias/mL	39
Imagen 5. Montaje experimental con los tubos de ensayo y el equipo láser infrarrojo	43
Imagen 6. Equipo odontológico Wiser Láser infrarrojo de alta potencia con potencia máxima de 16 watts y longitud de onda de 980 nm utilizado en la desinfección de muestras de agua contaminadas	44
Imagen 7. Equipo de autoclave usado para la esterilización de materiales y caldos nutritivos	44
Imagen 8. Horno de secado utilizado para secar los materiales previamente esterilizados en la autoclave	45
Imagen 9. Incubadora utilizada para cultivar las cepas de <i>E. coli</i>	45
Imagen 10. Agitador Vórtex empleado para homogeneizar las muestras contaminadas con bacteria	46
Imagen 11. Balanza analítica para pesar los reactivos utilizados en la preparación de los agares y caldos nutritivos.	46
Imagen 12. Agar Mueller Hinton de 500g OXOID	47
Imagen 13. Caldo Mueller Hinton de 500g Becton Dickinson	48
Imagen 14. Agar MacConkey de 500g Becton Dickinson	48
Imagen 15. Agar EMB de 500g de Merck	49
Imagen 16. Diagrama de Pareto estandarizada para concentración bacteriana cepa clínica.	71
Imagen 17. Diagrama de Pareto estandarizada para concentración bacteriana cepa alimento.	72

INDICE DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Fichas de instrucciones de uso para los reactivos	81
Anexo B. Características cepa clínica y de alimentos	96
Anexo C. Materiales	98
Aneco D. Ficha técnica de equipos de laboratorio	100

GLOSARIO

AGENTE BIOLÓGICO PATÓGENO: todo agente externo que se aloja en un ente biológico determinado y que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea humano, animal o vegetal. El ente biológico que aloja a un agente patógeno se le denomina huésped. Los agentes patógenos pueden ser hongos, bacterias o virus.

BACTERIA: son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5 micrómetros de longitud) y presentan diversas formas, incluyendo filamentos, esferas, barras, sacacorchos y hélices. Son células procariotas por lo que a diferencia de las células eucariotas (presentes en animales, plantas, hongos, etc.) no poseen un núcleo definido ni presentan orgánulos membranosos internos. Además, poseen una pared celular que está compuesta por peptidoglicano.

BIOINDICADOR: o indicadores biológicos son organismos que pueden ayudar a descifrar cualquier acontecimiento o fenómeno que haya sucedido o esté sucediendo en un ambiente determinado. En otras palabras, son atributos de los sistemas biológicos los cuales se utilizan para determinar características ecológicas, del medio ambiente o sobre el impacto que tienen algunas prácticas sobre el medio en cuestión.

CONTROL POSITIVO: tubo de ensayo con muestra de agua contaminada al cual no se le hace incidencia del láser infrarrojo.

DENSIDAD ÓPTICA: es una magnitud física que mide la absorción de un elemento óptico por unidad de distancia para determinada longitud de onda. El valor de densidad óptica se obtiene de la lectura en un espectrofotómetro.

DESINFECCIÓN: es un proceso físico o químico que tienen la función de matar o inactivar agentes patógenos como las bacterias, virus y protozoos, impidiendo el crecimiento de microorganismos patógenos. Además, reducen los organismos nocivos a tal nivel que no causan daños a la salud ni a la calidad de los bienes perecederos.

MICROORGANISMO: los microorganismos son seres vivos que solo se pueden visualizar con un microscopio. Algunos microorganismos pueden ser patógenos y causar enfermedades tanto a personas como animales.

RADIACIÓN INFRARROJA: la radiación infrarroja o IR es un tipo de radiación electromagnética de mayor longitud de onda que la luz visible. Tiene menor frecuencia que la luz visible y mayor que las microondas. El rango de longitudes de onda va desde 0,7 hasta los 1000 micrómetros. La radiación infrarroja es emitida

por cualquier cuerpo cuya temperatura sea mayor que 0 Kelvin, es decir -273,15 grados Celsius.

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS: las unidades formadoras de colonias o UFC es un valor que indica el grado de contaminación microbiología que presenta un medio. En otras palabras, determina cuantos microorganismos se encuentran presentes en un medio en determinado volumen de agua expresado en metro cúbico.

RESUMEN

El agua es una fuente vital para la vida del ser humano y su consumo no solamente es importante sino necesario, pero al mismo tiempo es un excelente medio para que en ella se desarrollen y reproduzcan bacterias patógenas y especialmente la *Escherichia coli* más conocida como *E.coli*, causante de enfermedades gastrointestinales que se presentan sobre todo en niños menores de 5 años a causa de la ingesta de agua contaminada por lo cual se requiere de su potabilización y que se pueda consumir sin que exista riesgo alguno para la salud de las personas.

La desinfección del agua puede realizarse mediante procesos físicos o químicos que permiten la eliminación de agentes contaminantes. Los métodos más utilizados son los químicos tales como la cloración y la ozonización, y los métodos físicos como la radiación ultravioleta en menor escala.

Los procedimientos mediante la utilización de elementos químicos, si bien cumplen con el objetivo, en muchas de las veces tienen efectos secundarios en las personas, es por eso que se busca la utilización de procesos que a la vez que logren desinfectar el agua, no presenten efectos secundarios y es por ello que se prueba con la utilización de luz infrarroja que no se le conocen efectos adversos en el ser humano, pero que tampoco se tiene mucho conocimiento sobre los efectos inhibidores de la presencia patógenos en el agua.

El desarrollo del presente trabajo permitirá que en un primer capítulo se haga un acercamiento a las generalidades del agua, de los métodos y procesos de desinfección existentes a los cuales es sometida; el conocimiento de la bacteria *E.coli*, al igual que las generalidades de la luz láser y sus aplicaciones.

En un segundo capítulo se mostrará el desarrollo experimental que permita evaluar los efectos que tiene la luz láser infrarroja en la desinfección del agua con presencia de la bacteria *E.coli*

En el tercer capítulo se realizará un análisis de los resultados una vez desarrollado el experimento donde se explicará el efecto que tiene la luz láser infrarroja en la inhibición de la bacteria *E.coli*.

Finalmente, un cuarto capítulo describirá los costos en los cuales se incurre para este proceso, y se llega a unas conclusiones sobre la viabilidad de la utilización de este método de desinfección que permita obtener resultados satisfactorios con menores costos para la población.

Palabras claves: Bacteria, microorganismo, agua potable, desinfección, patógeno, radiación infrarroja, láser, control positivo.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial y especialmente en países en vías de desarrollo, las enfermedades gastrointestinales son la causa de muerte de niños menores de 5 años. La ingesta de agua o alimentos donde se encuentra la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) es la principal causante de estos casos de mortalidad y morbilidad. La *Escherichia coli* más conocida como *E. coli*, se aloja generalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos o animales de sangre caliente.¹

La *E. coli* es una bacteria anaerobia facultativa Gram negativa que se caracteriza según la Resolución 2115 del Ministerio de Protección Social de la República de Colombia (2007), por tener enzimas específicas como la β galactosidasa y β glucoronidasa, y ser uno de los principales organismos patógenos en el ser humano causante de enfermedades gastrointestinales con presencia de náuseas, vómito, diarrea, y fiebre, afectando y colonizando los sistemas urinario, nervioso y sanguíneo. Estas bacterias se pueden eliminar del organismo por medio de las heces fecales de seres humanos y animales, siendo las heces una fuente de contaminación y transmisión de la bacteria.

La presencia de *E. coli* se usa como un indicador de contaminación del agua, lo que permite determinar si el líquido es apto para consumo humano. La presencia de esta bacteria en el agua es un claro indicio de la contaminación por materia orgánica y por microorganismos asociados. De acuerdo con la Resolución 2115 de 2007 del Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia en su artículo 11 parágrafo (2) dos, se determina que “ninguna muestra de agua para consumo humano debe contener ningún individuo perteneciente a la especie *E. coli* en 100 cm³ de agua”.

Dentro de los sistemas de desinfección usados para eliminar bacterias y microorganismos patógenos se encuentran los métodos de desinfección de tipo químico, en el cual se destacan los métodos de cloración y ozonización que son los comúnmente utilizados. Estos compuestos químicos por lo general son oxidantes fuertes que tienen gran eficiencia en la eliminación de los microorganismos, pero pueden dejar remanentes tóxicos en el agua los cuales requieren un control estricto para evitar riesgos en la salud de los consumidores². Otros métodos de desinfección de agua potable son los métodos de tipo físico, como la sedimentación natural, la filtración, y la irradiación con luz ultravioleta (UV); El propósito de la presente

¹Rodríguez-Angeles Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. En: SALUD PÚBLICA DE MÉXICO. Jan 1, vol. 44, no. 5, p. 464-475

²CHULLUNCUY-CAMACHO, Nadia Cristina and Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Perú). Tratamiento de agua para consumo humano. En: INGENIERÍA INDUSTRIAL. Mar 11.

investigación es la de evaluar la radiación con rayos láser infrarrojo como técnica de desinfección de agua.

Según la Patente 200602528 de la Oficina Española de Patentes y Marcas (2010), la desinfección mediante radiación laser utiliza la banda del infrarrojo la cual se dosifica al medio contaminado afectando a los organismos presentes de manera que los incapacita a reproducirse y los elimina por completo, logrando así una calidad óptima del agua a consumir³. La Radiación Infrarroja (IR) tiene ventajas sobre los otros sistemas de desinfección ya que no requiere el uso de productos químicos, los cuales pueden contaminar el agua; el láser infrarrojo no forma sustancias tóxicas, tienen un consumo moderado de energía y no afecta el contenido mineral del agua.

Con base en lo expuesto anteriormente, surge la idea de evaluar el método no convencional de radiación de láser infrarrojo, el cual tendrá como finalidad la eliminación de microorganismos patógenos (en este caso la *E. coli*) presentes en agua para consumo humano, todo esto a nivel laboratorio, a volúmenes de 4 ml por muestra y será una evaluación preliminar limitada por el equipo de láser infrarrojo. El acceso a esta tecnología podría reducir los efectos de los agentes químicos en la salud humana.

³EL LASER. DESINFECCION POR RADIACION LASER. [1]:

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar un láser infrarrojo como método de desinfección de agua sobre un medio acuoso con presencia de bacterias *E. coli*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Definir los parámetros críticos para el desarrollo del método de desinfección por radiación infrarroja.
- Establecer el grado de eliminación del láser infrarrojo en una solución acuosa que contiene bacterias *E. coli*.
- Determinar los costos para el desarrollo de un sistema de desinfección de aguas por el método de láser infrarrojo.

1. GENERALIDADES

Para el desarrollo de este proyecto, es necesario definir los conceptos relacionados con los procesos utilizados en la desinfección de agua para la eliminación de agentes contaminantes. En este capítulo se definirán los conceptos que permiten entender los diferentes procesos de desinfección, así como las características que debe tener el agua apta para el consumo humano, los diferentes agentes contaminantes que se pueden encontrar en las muestras de agua y se definirá el método propuesto de láser infrarrojo.

1.1 EL AGUA

Es la sustancia que más abunda en la tierra (97, 5% del total en el planeta es agua salada, mientras que el 2,5% restante es agua dulce) y se encuentra en los tres estados fundamentales de la materia (sólido, líquido y gaseoso), es indispensable para el desarrollo de la vida, debido a que sin ella ningún organismo podría sobrevivir. Químicamente el agua es una sustancia que está formada por dos átomos de hidrógeno y un átomo de oxígeno (H_2O). Los seres vivos en su mayoría están formados por agua; gracias a su composición química permite que los organismos vivos se desarrollen de forma eficiente interviniendo en todas sus funciones vitales incluyendo plantas y animales. El agua es indispensable para el desarrollo celular, metabólico y bioquímico en animales y plantas, destacándose diferentes actividades como respiración celular, producción de energía, eliminación de desechos y en muchos casos hasta la muerte celular⁴. Además, es vital para el desarrollo y crecimiento de plantas como el proceso fotosintético, producción de metabolitos secundarios y producción de alimento como reserva para momentos de estrés hídrico.

Una de las principales preocupaciones con respecto al agua es la escasez, que se presenta por diversas causas entre las cuales está el calentamiento global. En la tierra el 90% del agua es de mar salada, el 2% es hielo y se encuentran en los polos y solo el 1% es agua dulce, la cual se encuentra en los ríos, lagos y mantos subterráneos⁵. Así pues, como el mayor porcentaje de agua disponible en el planeta es agua salada, es necesario incurrir en procesos de tratamientos los cuales permiten la eliminación de partículas y microorganismos que pueden ser perjudiciales para la salud.

El agua apta para el consumo humano debe ser tratada con agentes químicos y/o físicos con el fin de purificar y desinfectar la misma de agentes contaminantes que

⁴BRINEZ A., Karol J.; GUARNIZO G., Juliana C. and ARIAS V., Samuel A. Calidad del agua para consumo humano en el departamento del Tolima. En: REVISTA FACULTAD NACIONAL DE SALUD PÚBLICA. May 1, vol. 30, no. 2, p. 175

⁵ R. M. Z., Roberto. La problemática global del agua.

pueden llegar a ser perjudicial para la salud humana. Dentro de los principales contaminantes del agua se encuentran las bacterias patógenas que son las causantes de enfermedades gastrointestinales que se presentan sobre todo en niños menores de 5 años.

El agua potable es aquella que se puede consumir sin que exista riesgo alguno para la salud de las personas, para esto es necesario que sea tratada adecuadamente en plantas especializadas para este fin, en donde al final y mediante procesos de desinfección adecuados, se obtiene el agua apta para el consumo humano y sin ningún riesgo de que presente agentes contaminantes.

1.2 DESINFECCIÓN DE AGUA PARA CONSUMO HUMANO

La desinfección de agua es un proceso físico o químico que se utiliza para eliminar agentes contaminantes (microorganismos principalmente) presentes en el agua, con el fin de que el agua al final sea apta para su posterior consumo. El uso de sistemas de desinfección hoy en día es de vital importancia, más si se tiene en cuenta los numerosos casos que se están presentando (principalmente en niños) de enfermedades relacionadas con el consumo de agua contaminada.

Existen diversas técnicas para la desinfección y purificación de aguas para el consumo humano, las cuales se pueden clasificar según su naturaleza, es decir si son procesos de carácter químico o físico. Dentro de los químicos las técnicas más usadas son la cloración y la ozonización. En las técnicas físicas está la radiación ultravioleta.

1.3 METODOS QUÍMICOS

1.3.1 Cloración. La cloración es la técnica más comúnmente utilizada para la desinfección de agua para consumo humano, la cual consiste en la utilización de cloro y sus derivados como desinfectante (Figura 1). La cloración tiene un papel muy importante en el proceso de desinfección, evitando las infecciones y ayudando a prevenir enfermedades debido a que el cloro tiene la característica de destruir los organismos patógenos del agua en condiciones ambientales y en tiempo corto. Así mismo es fácil de usar, tiene un manejo sencillo, un bajo precio, además de que tiene un efecto residual que protege el agua de una posterior contaminación⁶.

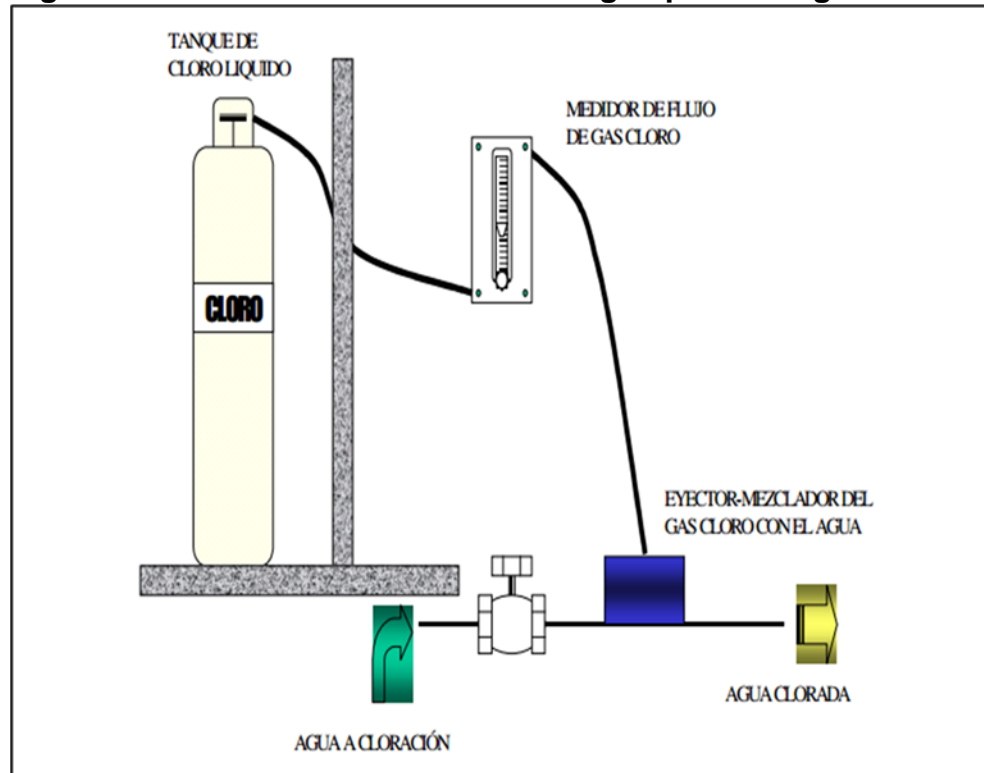
Para realizar una desinfección con cloro de manera eficiente es necesario que se tengan en cuenta variables como el tipo de microorganismo que se quiere eliminar,

⁶5.0 ANTECEDENTES: DESINFECCIÓN Y MÉTODOS DE DESINFECCIÓN DEL AGUA. [1]:

la concentración de cloro necesaria para desinfección, el tiempo de contacto entre otros.⁷

Sin embargo, el cloro presenta entre otras desventajas que es muy corrosivo, puede producir un sabor desagradable en el agua, inclusive en pequeñas concentraciones que no tienen riesgo alguno para el consumidor, su manejo y almacenamiento requiere de un especial cuidado, debido a que presenta riesgos para la salud de quienes lo manejan.

Figura 1. Sistema de desinfección de agua por cloro gaseoso.



Fuente: “Desinfección y métodos de desinfección de agua”. 12 de marzo de 2015.
<http://www.oocities.org/edrochac/sanitaria/desinfeccion5.pdf>

1.3.2 Ozonización. La ozonización es otro método que se usa para desinfección de aguas. Este método surge por la problemática que se presentó con la cloración, puesto que se estaban generando subproductos como los trihalometanos (THM), que son sustancias que se forman al reaccionar la materia orgánica con el cloro. La aplicación de la ozonización como método de desinfección de aguas potables se

⁷ OSORIO ROBLES, Francisco; TORRES ROJO, Juan Carlos and SÁNCHEZ BAS, Mercedes. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes: aplicación de procesos industriales a la reutilización de aguas residuales. Madrid, ES: Ediciones Díaz de Santos, 2010.

está aplicando en la actualidad, pero no solamente aplicable a aguas potables sino también a aguas residuales⁸.

El ozono tiene un gran poder oxidante, siendo este el que le da la característica de desinfectante comparado con otros productos basados en cloro.

Dentro de los principales métodos de generación de ozono se encuentran los siguientes:

- Electrólisis.
- Generación fotoquímica.
- Generación radioquímica.
- Descarga eléctrica de alto voltaje.

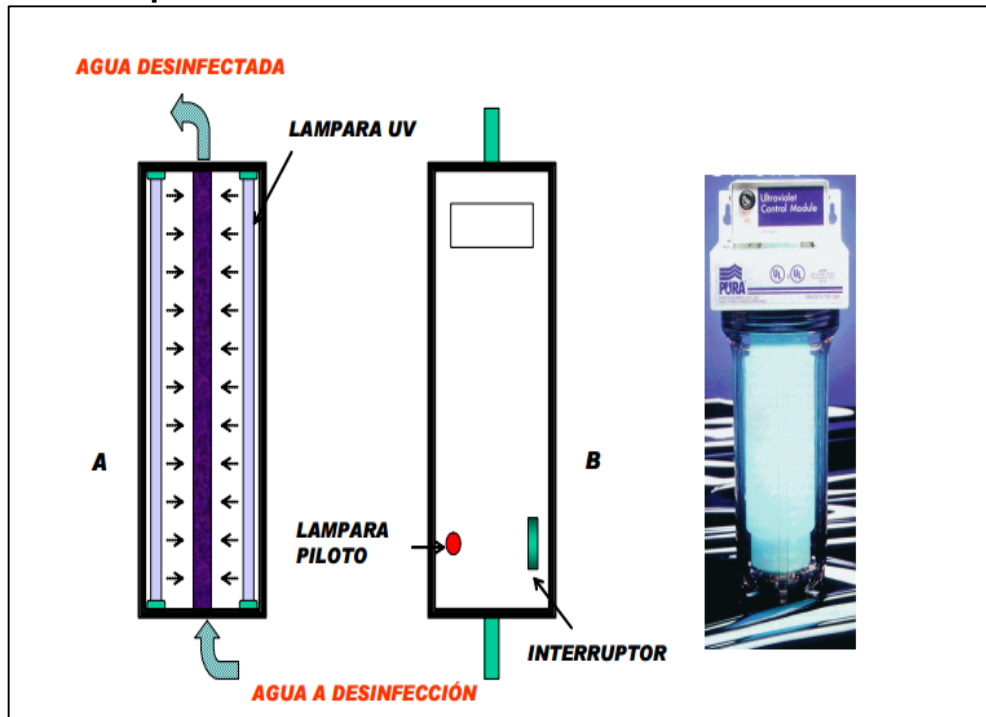
1.4 METODOS FÍSICOS

La desinfección por radiación ultravioleta (UV) es uno de los métodos de desinfección más prácticos y eficientes en aguas residuales, debido a la capacidad que tiene de inactivar bacterias. Este método es una alternativa de desinfección a los métodos tradicionales por cloración y ozonización, puesto que la radiación UV provee una desinfección efectiva sin producir ningún cambio físico o químico en el agua (Figura 2). El mecanismo de desinfección por ultravioleta se basa en la incidencia de ondas cortas de radiación UV sobre los microorganismos, a los cuales destruye o inactiva como resultado de una alteración o daño fotoquímico sobre su ADN.

La desinfección por ultravioleta brinda entre otras ventajas la eliminación o inhibición de microorganismo, no presenta efectos residuales que puedan afectar a seres humanos, por ser un proceso físico no requiere de uso de sustancias químicas que alteren o contaminen el agua que está siendo desinfectada entre otros. La cantidad mínima de intensidad radiación para inactivación de virus y bacterias es de 10.000 $\mu\text{watts-seg/cm}^2$. Como desventajas el método por UV puede no desactivar de manera efectiva microorganismo si la dosificación es muy baja, y en algunos casos estos microorganismos son capaces de resistir la radiación ultravioleta y se presenta el fenómeno de foto-reactivación, en el cual los microorganismos son capaces de reparar sus ácidos nucleicos dañados.

⁸OSORIO ROBLES,Francisco; TORRES ROJO,Juan Carlos andSÁNCHEZ BAS,Mercedes. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes: aplicación de procesos industriales a la reutilización de aguas residuales. Madrid, ES: Ediciones Díaz de Santos, 2010.

Figura 2. Lámpara de UV mostrando detalles en A y con la cubierta protectora del sistema B.



Fuente: “Desinfección y métodos de desinfección de agua”. 12 de marzo de 2015.
<http://www.oocities.org/edrochac/sanitaria/desinfeccion5.pdf>

1.5 LA LUZ LASER

La palabra láser es un acrónimo que proviene de las iniciales "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" (LASER) que significa amplificación de luz por emisión estimulada de radiación. Este dispositivo controla o dirige la forma en que los átomos emiten energía en forma de fotones, transformando otras formas de energía en radiación electromagnética.

La luz ha sido utilizada durante muchos siglos como agente terapéutico, así en la antigua Grecia el sol se utilizaba en la helioterapia. Los chinos lo utilizaban para el tratamiento del cáncer de piel y aún la psicosis. En 1917 a partir de la teoría de Albert Einstein sobre la naturaleza corpuscular de la luz aparece el concepto de “emisión estimulada”. La luz láser es una radiación electromagnética que se produce como resultado de la emisión de luz a partir de incontables átomos o moléculas individuales⁹.

La unidad básica de la luz es llamada fotón. Cuando un átomo es estimulado por medio de un fotón de luz, pasa a un nivel de energía superior; esto se

⁹ El láser, la luz de nuestro tiempo. [1]:2010.

llama "absorción". Cuando el átomo regresa a su estado fundamental, emite una luz incoherente; esto se llama "emisión espontánea"¹⁰. Si este átomo fuese nuevamente bombardeado por un fotón de luz, igual al fotón que inicialmente lo estimuló, pasaría al nivel de energía superior, y al descender al estado original, formaría dos fotones de luz, que serán idénticos en longitud de onda, fase y coherencia espacial; esto se llama "emisión estimulada"¹¹. Ambos fotones son capaces de estimular la emisión de más fotones semejantes a ellos mismos, y cada uno de estos formará una luz con características especiales. La luz producida por un láser consiste de fotones del mismo tamaño, movimiento y dirección, siendo entonces el rayo de luz de alto poder distintivo espectral, con características bien definidas¹².

1.5.1 Características de la luz láser. La luz láser tiene diferencias con la luz normal (Figura 3) y presenta características bien definidas y específicas tales como:

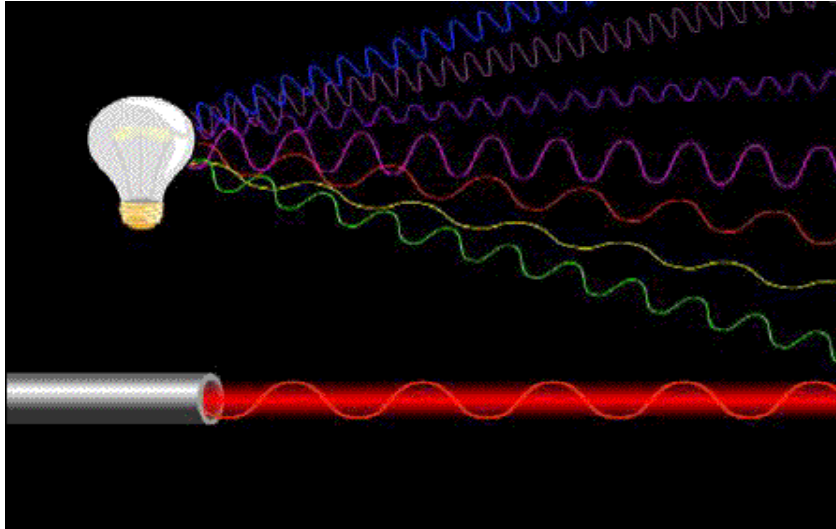
- **Monocromática:** la luz monocromática solo presenta una longitud de onda, es decir los láseres emiten un intervalo de frecuencia lo suficientemente estrecho como para que su emisión se considere monocromática. Esto se presenta gracias a la emisión estimulada, ya que al ser los fotones iguales presentan la misma longitud de onda.
- **Coherente:** Esto significa que una onda electromagnética es coherente cuando su fase no varía aleatoriamente a través del espacio o a lo largo del tiempo. Este efecto es resultado de la emisión estimulada, en la que cada nuevo fotón es emitido de forma idéntica a los anteriores.
- **Direccionalidad:** En una sola dirección, ya que todas las ondas emitidas están casi paralelas y por tanto no hay divergencia del rayo de luz, por lo que permanece invariable aún después de largos recorridos. Es además importante para muchas aplicaciones en las que concentrar la energía en una zona determinada es la prioridad.

¹⁰ Beam. The Race to Make the Laser. Jeff Hecht. Editorial Oxford University Press: New York, 2005.

¹¹ EL LASER. DESINFECCION POR RADIACION LASER. [1]

¹² Fundamentals of Light Sources and Lasers. Mark Csele, John Wiley & Sons, 2004.

Figura 3. Diferencia entre la luz normal y la luz láser.



Fuente: “Albert Einstein estableció los fundamentos para el desarrollo de los láseres, pero ¿qué son y cómo funcionan?”. 10 de enero de 2014. <http://www.teinteresasaber.com/2014/01/albert-einstein-establecio-los.html>

De acuerdo a la figura 3 las diferencias entre la luz normal y la luz láser son que la luz natural está compuesta por muchas longitudes de onda, mientras que la luz láser por una longitud de onda precisa, la luz natural tiene diversas frecuencias de intensidad, mientras que la luz láser tiene frecuencia de alta intensidad, razón por la cual la luz natural se expanda de forma desordenada y la láser en forma ordenada.¹³

El láser se basa en un medio activo líquido, sólido o gaseoso, que emite luz cuando es excitado por una fuente de energía. Esta fuente de excitación puede ser una reacción química, eléctrica u óptica, incluyendo el bombeo por otro láser.

Ejemplo; un láser de gas funciona de la siguiente manera:

El interior del láser consiste en un tubo de vidrio lleno de gas excitado por una corriente eléctrica que lo atraviesa. El tubo de gas tiene un espejo en cada extremo. La corriente eléctrica excita los átomos del gas que pasan a emitir fotones, energía luminosa. Algunos de los fotones emitidos chocan con otros átomos excitados que como respuesta emiten fotones idénticos. (Emisión estimulada de radiación.)

Cuando un fotón choca con un átomo excitado produce otro fotón idéntico, ambos fotones pueden a su vez chocar con otros átomos excitados y volver a producir más

¹³ Chang, R. (1999). Capítulo 7: Teoría Cuántica y la estructura electrónica de los átomos. En Editor Gloria Leticia Medina Vigil (Ed). *Química*. (244-257). México: McGraw Hill. Interamericana Editores S.A.

fotones que a su vez chocarán con otros átomos, y así sucesivamente. Parte de los fotones chocan con los espejos y se reflejan hacia el interior del gas, donde continúan la amplificación y la emisión estimulada. El espejo situado en el extremo donde se emite el haz de láser es semireflectante para así dejar pasar parte de la luz; siempre que refleje hacia el interior un número de fotones suficientes para mantener la amplificación. Sólo los fotones que se mueven paralelamente al eje del tubo chocan con los espejos y se amplifican produciendo así un haz de luz láser monocromático y coherente¹⁴.

1.5.2 Láseres según su medio activo. Una de las clasificaciones de los tipos de láser es de acuerdo al medio activo utilizado y así nos encontramos con la siguiente clasificación

- Láser a Gas:
 - De mezcla de gases atómicos (He-Ne)
 - Moleculares (CO₂, vapores de H₂O)
 - De átomos ionizados (Argón, Criptón, Xenón)
- Láser en estado Sólido: En ellos se introduce una especie atómica de comportamiento inestable, como aditivo, en un vidrio o cristal. Es el caso del Neodimio, que se introduce en un cristal YAG (yttrio, aluminio, granate) y el Erblio.
- Láser Semiconductores o diódicos: El más utilizado es el diódico de arseniurico de galio y aluminio (As, Ga, Al)

1.5.3 Láseres según su potencia. La luz láser también puede clasificarse de acuerdo a la potencia en que es emitida la energía de luz.

- Láser de Alta potencia o Quirúrgicos: Este tipo de láser corta según su longitud de onda tejidos duros como hueso, esmalte, dentina, cemento radicular, tejidos blandos como encías, mucosas, ligamentos o ambos tejidos duros y blandos. Es empleado para cirugías tanto en medicina como en odontología y posee un alto poder descontaminante de bacterias en boca, por lo cual se utiliza en el tratamiento de abscesos, infecciones periodontales y descontaminación de caries.
Dentro de los láseres de alta potencia encontramos los de Argón, Diodo, Neodimio YAG, Erbio y CO₂
- Láser de Baja y mediana potencia: También llamados “blandos” o terapéuticos tienen como característica que no cortan los tejidos ni descontaminan, trabajan a baja potencia y su función es la de bioestimular las funciones celulares y alterar

¹⁴ The Laser Guidebook. J. Hecht, 2nd edition McGraw-Hill, 1992.

el metabolismo celular a través del estímulo o de la inhibición de las reacciones bioquímicas. Esta bioestimulación se puede dar en células estresadas que estén en bajo o mal funcionamiento o inhibición en caso de células estresadas en exceso como neuralgias, dolor e inflamación. Este tipo de láseres se utilizan en el tratamiento del dolor por su efecto analgésico, regeneración tisular, edemas y cicatrización.

Los láseres de baja potencia más conocidos son: Arseniuro de Galio (As Ga), Arseniuro de Galio y Aluminio (As Ga Al), y Helio Neón (He Ne)

Para los láseres de baja potencia el efecto bioestimulador está determinado por factores como la longitud de onda, la dosis, el ángulo de incidencia, la distancia, potencia, tiempo, frecuencia, tipo de tejido, técnica de aplicación y área del tejido.

Tanto para los láseres de alta como de baja las variables determinantes a la hora de usarlos en algún tratamiento son el tiempo, la potencia y la dosis.

Los Láser Terapéuticos se clasifican según su longitud de onda en el espectro electromagnético en:

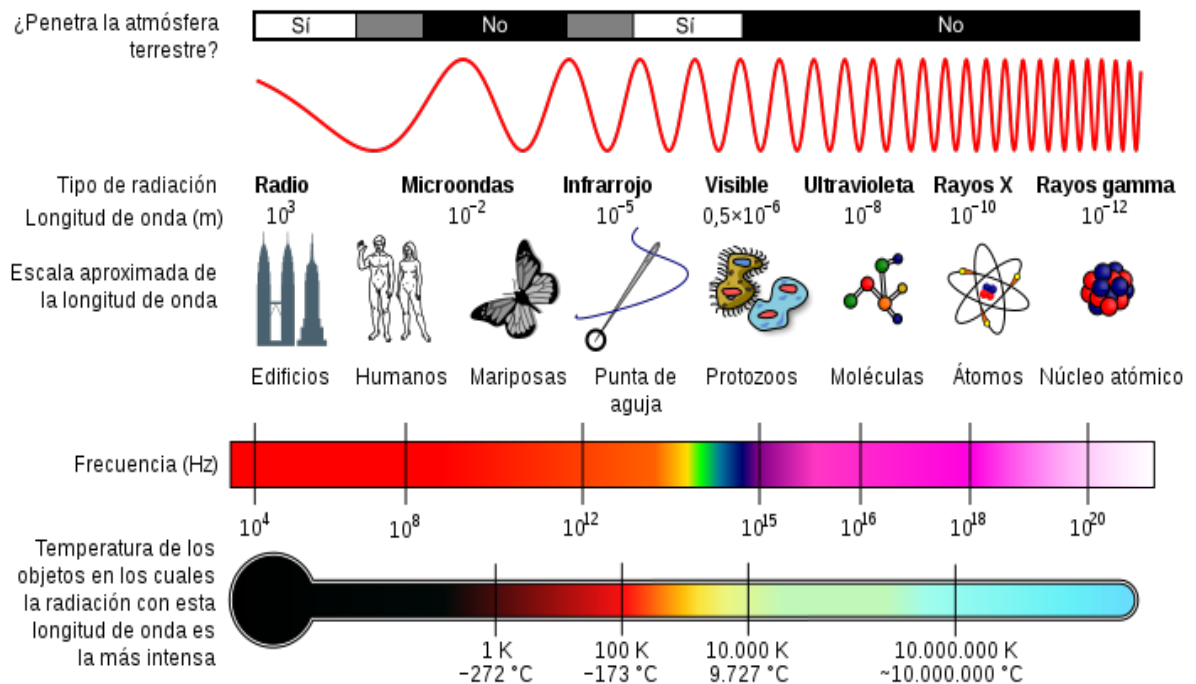
- Emisión Roja: 660nm radiación visible al ojo humano (620 a 690nm).
- Emisión Infrarroja: 830nm radiación invisible al ojo humano (de 750 a 1500nm).

El Láser de acuerdo a su longitud de onda:

● Rojo	760-630 nanómetros
● Naranja	630-600 nanómetros
● Amarillo	600-570 nanómetros
● Amarillo-verdoso	570-550 nanómetros
● Verde	550-520 nanómetros
● Verde-azulado	520-500 nanómetros
● Azul	500-450 nanómetros
● Violeta	450-380 nanómetros

1.5.4 Espectro electromagnético. El espectro electromagnético de la luz visible cambia de acuerdo con la longitud de onda y por tanto su coloración también cambia para dar lo que se conoce como luz ultravioleta o infrarroja (Figura 4).

Figura 4. Espectro electromagnético de luz visible



Fuente: "Espectro electromagnético". 30 de octubre de 2012.
<http://biologicalili.blogspot.com.co/2012/10/espectro-electromagnetico.html>

El rango en el que se encuentra el infrarrojo en longitud de onda (expresada en metros) está entre $1 \times 10^{-3} \text{m}$ y $2,5 \times 10^{-6} \text{m}$ como se observa en la figura 4.

La franja de emisión del rayo láser es una zona no ionizante, por lo que no serían mutagénicos a diferencia de los rayos X o gamma que sí lo son.

En los laser de alta potencia o Quirúrgicos ya que se trata de diferentes longitudes de onda, no siempre van a ser absorbidos de igual forma, produciendo una amplia gama de efectos relacionados con su absorción. Cada longitud de onda tendrá una mayor o menor afinidad de ser absorbida por los cromóforos de los tejidos o materiales afines a esa longitud de onda¹⁵. Los cromóforos son los elementos que se encuentran en los tejidos y son los que absorben la longitud de onda del láser.

¹⁵ Laser Fundamentals. W. T. Silfvast, Cambridge University Press, Cambridge, 2004.

Según la temperatura que adquiera el tejido, rompen las uniones químicas de las moléculas y se pueden producir diferentes efectos, pudiendo variar desde una hipertermia transitoria hasta la carbonización del mismo. Generan calor hasta 120 grados Celsius (Tabla 1).

Tabla 1. Efectos del láser sobre el tejido a diferentes temperaturas.

Temperatura	Efecto Biológico	Observaciones
37°C	Normal	Temperatura media del cuerpo humano
45°C	Hipertermia	Destrucción de enlaces en las moléculas y alteraciones en la membrana.
60°C	Coagulación del tejido y necrosis de las células	Desnaturalización de las proteínas y del colágeno.
100°C	Vaporización y ablación térmica	Debido al incremento del volumen, se observan burbujas de gas que inducen a rupturas mecánicas en el tejido adyacente.
>100°C	Carbonización	Se ennegrece el tejido y aparece humo.
>300°C	Fusión	

Fuente: “El láser la luz de nuestro tiempo”. 2010.
http://optica.usal.es/gioe/images/El_laser.pdf

1.6 *ESCHERICHIA COLI*

La *E. coli* es una bacteria que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y en animales de sangre caliente. También se puede encontrar en las heces fecales de seres humanos y animales, siendo estas heces una de las formas de contaminación y transmisión de la bacteria¹⁶.

Dentro del grupo de las *E.coli* se pueden encontrar bacterias que son patógenas, es decir que son causantes de enfermedades y esto va de acuerdo a las características que presentan sus factores de virulencia. Dentro de las *E.coli* patógenas se encuentran las siguientes cepas: *E.coli enterotoxigénica* (ETEC), *E.coli enteropatógena* (EPEC), *E.coli enterohemorrágica* (EHEC), *E.coli*

¹⁶Rodríguez-Angeles Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. En: SALUD PÚBLICA DE MÉXICO. Jan 1, .vol. 44, no. 5, p. 464-47.

enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* *enteroagregativa* (EAEC) y *E.coli* *enteroadherente* difusa (DAEC). De acuerdo a las características de la cepa se pueden presentar las enfermedades gastrointestinales en las personas, bien sea vómito, náuseas, diarrea y fiebre entre otros.

1.6.1 *E.coli* enterotoxigénica (ETEC). Las cepas de ETEC son una causa importante de diarrea en niños menores de 5 años. Se pueden presentar de 8 a 12 evacuaciones al día por un periodo de 4 a 5 días. Es reconocida como la causal de la diarrea del viajero que se caracteriza por diarrea acuosa con o sin fiebre. La ETEC se puede adquirir por el consumo de vegetales fresco y agua¹⁷.

1.6.2 *E.coli* enteropatógena (EPEC). Se presenta como una enfermedad en niños menores de 2 años y es la causa importante de diarrea en lactantes. Puede producir una diarrea secretora y se puede asociar con fiebre la cual si no se controla puede conducir a la deshidratación y finalmente la muerte. Las epidemias por La EPEC se deben al consumo de agua contaminada y productos cárnicos¹⁸.

1.6.3. *E.coli* enterohemorrágica (EHEC). Causan diarreas con sangre y a veces puede dañar los riñones. Las evacuaciones líquidas se acompañan de una descarga hemorrágica. Se da en países de clima templado como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra y Japón; el cuadro clínico que presenta es colitis hemorrágica que es la diarrea inicial con dolor abdominal. La causa más común de esta infección es el consumo de carne sin cocinar o poco cocinada.

1.6.4 *E.coli* enteroinvasiva (EIEC). El cuadro clínico que presenta esta infección, es afectación en la mucosa del colon, evacuaciones de poca cantidad acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre. Además, se encuentra estrechamente relacionada con el género *Shigella*, que produce una enfermedad similar a la shigelosis. La causa de esta infección es por ingesta de alimentos o agua.

1.6.5 *E.coli* enteroagregativa (EAEC). Se caracteriza por presentar cuadros de diarrea persistentes en niños que puede durar más de 14 días. El cuadro clínico que presenta es una diarrea secretora acuosa con moco y sangre, con fiebre en bajo grado.

¹⁷GOEZ LOPEZ, *et al.* DETERMINACION Y DIFERENCIACION DE ESCHERICHIA COLI Y COLIFORMES TOTALES USANDO UN MISMO SUSTRATO CROMOGENICO. [1]:

¹⁸RODRÍGUEZ-ANGELES,Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. En: SALUD PÚBLICA DE MÉXICO. Sep.vol. 44, no. 5,

1.7 VARIABLES PARA EL ANÁLISIS DE DESINFECCIÓN DE AGUA

Teniendo en cuenta las características de los láseres de baja y alta potencia se escoge el equipo que brinde las mejores condiciones para el desarrollo experimental con las muestras de agua contaminada. Para esto hay que evaluar cuáles son las variables que afectan a la variable de respuesta, que para este caso será la concentración bacteriana final.

Dentro de las variables que tienen mayor influencia sobre la variable de respuesta están la longitud de onda, el tiempo y la potencia de equipo láser.

Se trabajará con un equipo láser de alta potencia, pues las características que brinda este equipo permiten un adecuado desarrollo experimental. Este equipo cuenta con una longitud de onda de 980 nm y potencias de hasta 16 watts, pero hay que aclarar que este equipo es usado para fines odontológicos, por lo que se presentan limitaciones para su uso.

En odontología se usan potencias hasta 3 Watts a tiempos de 30 a 60 segundos en pacientes, por lo que el equipo no está diseñado para usarse a tiempos más prolongados y potencias más altas, sin embargo para este caso se trabajara a tiempos de hasta 270 segundos y potencia máxima de 10 Watts.

Para las variables, a mayor potencia mayor efecto sobre la célula solo hasta que se llega al umbral de absorción de energía de los tejidos. Una vez superado ese umbral, se puede detener la modulación o incluso inhibir las funciones. En alta potencia se sobrepasa el límite de sobrevivencia de las células.

Un aumento en el tiempo de emisión da un mayor efecto bioestimulante hasta llegar a un umbral de absorción máximo en los tejidos.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El presente capítulo muestra la metodología utilizada para el desarrollo experimental realizado en el laboratorio. Se explica detalladamente como se realizó la identificación de la *E.coli* y su posterior cultivo; también como se prepararon las muestras contaminadas, la estandarización de la concentración y el montaje e incidencia del equipo de láser infrarrojo sobre las muestras a tratar.

Se muestran los equipos utilizados para la realización de los ensayos y los reactivos empleados para la preparación de los agares y caldos nutritivos que brindan las condiciones propicias para el crecimiento de la *E.coli*; así como las cepas utilizadas en los ensayos usando el equipo de láser infrarrojo.

2.1 METODOLOGÍA

En este capítulo se describe la metodología utilizada para evaluar el efecto que tiene un láser infrarrojo en la desinfección de un agua patrón *con E. coli*, así como los equipos utilizados para el desarrollo experimental en el laboratorio, los materiales y reactivos usados en la preparación de las muestras y las cepas de *E. coli* que se manejaron en los diferentes ensayos propuestos en la metodología.

Para evaluar el efecto desinfectante del equipo de láser infrarrojo se define la metodología que permite el desarrollo experimental a nivel laboratorio. Dentro de los aspectos a definir están el planteamiento del problema, diseño experimental, la determinación de variables, los materiales, equipos y reactivos usados para el montaje de las muestras, las cepas de *E. coli* a trabajar y como hacer la preparación de las muestras.

2.1.1 Planteamiento del problema. La hipótesis que se plantea para el desarrollo de este proyecto es el consumo de agua contaminada con presencia de *E. coli* es la principal causante de enfermedades gastrointestinales. Con base a esta problemática surge la idea de evaluar un método alternativo como lo es el láser infrarrojo que permita la desinfección de microorganismos patógenos presentes en el agua.

2.1.2 Diseño experimental. El desarrollo de este diseño de experimentos permite hacer un análisis del efecto que tienen las variables previamente establecidas (tiempo y potencia) sobre la variable de respuesta (concentración bacteriana en cada uno de los experimentos).

Para el diseño experimental se plantea un conjunto de pruebas que permite analizar los datos obtenidos de manera estadística. Por tanto, y con el fin de identificar el número de ensayos se realiza un diseño factorial 3^2 (n^k), es decir un diseño con 2 factores y 3 niveles. Los factores de interés serán el tiempo de exposición y la potencia de la fuente de luz (láser) a la cual estará sometida el agua a tratar. En

cuanto a los niveles, para el tiempo de exposición se evaluarán 3 tiempos diferentes de 30, 90 y 180 segundos teniendo en cuenta la tesis “Infrared and photocatalytic studies of model bacterial species for water treatment” en la cual evalúan el efecto del láser infrarrojo en tiempos comprendidos entre 0 y 270 segundos para tratamiento de aguas con presencia de bacterias. En estos tiempos se evidenció efecto del láser infrarrojo sobre la concentración bacteriana. Para la potencia de la luz incidente se prueban los valores de 4, 7 y 10 watts teniendo en cuenta la potencia máxima recomendada por el fabricante del equipo.

2.2 IDENTIFICACIÓN DE *E. coli*

Para confirmar que las cepas bacterianas corresponden a la especie de *E. coli*, se realiza el procedimiento de siembra en medios de cultivo diferenciales mediante la utilización de dos tipos de agares, el agar MacConkey y el agar Eosina azul de metileno (EMB) y se verifica su existencia mediante la observación.

2.2.1 Agar MacConkey. Es un medio de cultivo diferencial y selectivo para bacterias Gram negativas que tiene como característica la producción de colonias rosadas, secas y con punto central.

Realizada la siembra correspondiente en este agar, se pudo confirmar la presencia de *E. coli* que corresponde a la coloración rosada que se observa en dicho agar (Imagen 1).

Imagen 1. Crecimiento de cepas *E.coli* en agar MacConkey



2.2.2 Agar EMB. El agar Eosin-Azul de Metileno (EMB) es un medio de cultivo selectivo y diferencial para bacterias Gram negativas. Se caracteriza por diferenciar a las especies fermentadoras de lactosa y por producir colonias de color verde metalizado.

Realizada la siembra correspondiente se puede confirmar la presencia de *E. coli* ya que en dicho agar se pueden observar las colonias identificadas mediante el color verde metalizado (Imagen 2).

Imagen 2. Crecimiento de cepas *E. coli* en agar EMB



Luego de realizadas las pruebas y con la certeza de que las cepas a trabajar son de *E. coli*, se da comienzo al desarrollo y montaje experimental.

2.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS

Todas las cepas bacterianas se sembraron en caldo Mueller Hinton que es un medio nutritivo que facilita el crecimiento de microorganismos como la bacteria *E. coli*. Se realiza a una temperatura de 37 °C durante 18 horas; posteriormente se ajustó la concentración según el valor que se vaya a trabajar en las muestras. Para esto se usa la escala de MacFarland a 0,5¹⁹. Todos los ensayos se realizaron en una cabina de flujo laminar para evitar posible contaminación de las muestras procesadas.

2.3.1 Preparación de inóculo bacteriano. Luego de haber incubado la *E. coli* en los tubos de ensayo con el caldo, se sacaron de la incubadora y se llevaron a la cabina de flujo laminar donde se hizo el montaje de las diferentes muestras. Previamente se alista todo el material con el que se va a trabajar para luego pasarlos por la autoclave con el fin de esterilizarlos y posterior a esto se llevan a un horno de secado para que queden listo y en las óptimas condiciones para trabajar.

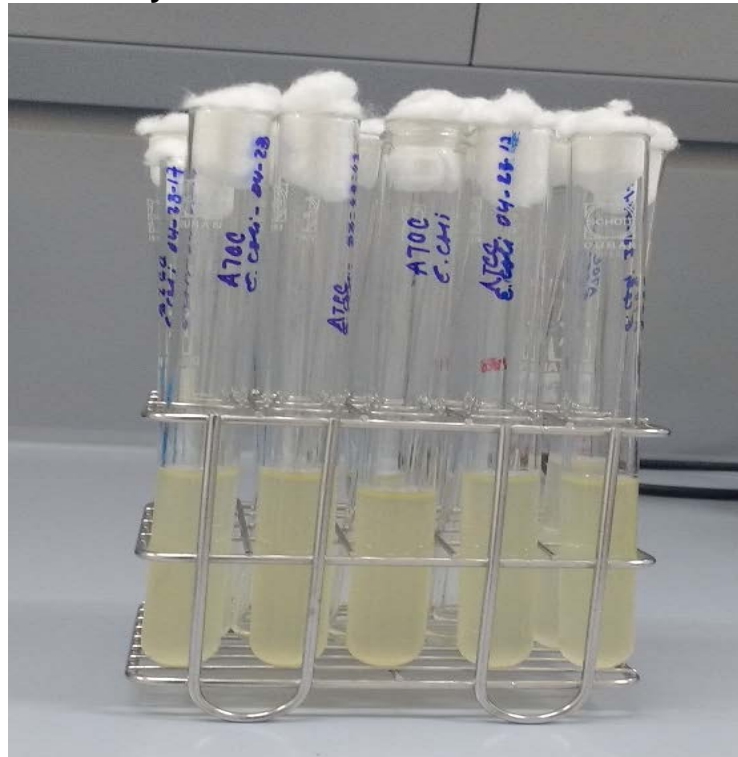
2.3.2 Estandarización de la concentración. Para las pruebas con el equipo de láser se manejaron dos concentraciones. Una que está en el rango 1×10^7 bacterias/mL y la otra en un rango de 1×10^8 bacterias/mL (Imagen 3). Estas

¹⁹La escala de MacFarland es utilizada como patrón de turbidez en la preparación de suspensiones de microorganismo. La escala toma valores desde 0.5 hasta 10, donde a 0,5 el patrón corresponde a $1,5 \times 10^8$ células/mL

concentraciones se escogieron de acuerdo al ajuste que se hizo en la escala de MacFarland a 0.5 que equivale a $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL aproximadamente²⁰.

Con los tubos de ensayo ya preparados a las concentraciones ya establecidas se tomaron muestras de 100 μ L de cada uno y se pasaron a una microplaca de 96 pozos con el fin de tomar en el equipo de espectrofotometría la lectura de absorbancia de cada muestra y corroborar el ajuste de MacFarland que se hace a cada tubo de ensayo. Si la lectura de absorbancia no coincide con el ajuste de MacFarland hay que seguir estandarizando las concentraciones hasta obtener el valor establecido. En caso de ser menor el valor de concentración quiere decir que la muestra esta diluida y necesita que se le adicione más bacteria. En caso de ser mayor el valor de concentración indica que la muestra está concentrada y hay que adicionarle más medio para que se diluya y la concentración disminuya.

Imagen 3. Tubos de ensayo con la concentración de 1×10^7 y 1×10^8 bacterias/mL.



²⁰ McFarland turbidity standard. 2012.

2.4 MONTAJE DE LAS MUESTRAS CON BACTERIA

Con las concentraciones ya ajustadas se procede a realizar el montaje de los 9 experimentos de acuerdo al diseño de experimentos previamente mencionado. Como en este caso se manejan 2 concentraciones diferentes el total de los ensayos a desarrollar es de 18, teniendo en cuenta que esto solo es para la primera replica. Para las siguientes replicas se hace el mismo procedimiento.

Los tubos de la izquierda marcados con color rojo son de la concentración de 1×10^7 bacterias/mL que corresponde a la cepa ATCC 25922 de *E.coli* y los de la derecha de color azul son los de concentración de 1×10^8 bacterias/mL correspondiente a la misma cepa ATCC 25922.

Imagen 4. Gradilla con los tubos de ensayo con inóculo de bacteria a concentración de 1×10^7 y 1×10^8 bacterias/mL .



La distribución en cada uno de los tubos se muestra en la tabla 2. Esta distribución sale del planteamiento inicial del diseño experimental. Cada tubo va rotulado con el tiempo (30, 90 y 180 segundos), la potencia (4, 7 y 10 watts) y la concentración a la cual se realizará cada ensayo.

Tabla 2. Distribución de los tubos de ensayo con inóculo bacteriano a diferente concentración.

Concentración de 1×10^7 bacterias/mL				Concentración de 1×10^8 bacterias/mL		
180s (4W)	180s (7W)	180s (10 W)		180s (4W)	180s (7W)	180s (10 W)
90s (4W)	90s (7W)	90s (10W)		90s (4W)	90s (7W)	90s (10 W)
30s (4W)	30s (7W)	30s(10W)		30s (4W)	30s (7W)	30s (10 W)

2.5 LECTURA INICIAL DENSIDAD ÓPTICA

Para cuantificar la cantidad bacteriana en las muestras se procede a medir el patrón de turbidez por densidad óptica con el espectrofotómetro, dejando todas las muestras con el mismo número aproximado de células bacterianas.

Para un espectrofotómetro de 600nm se puede calcular la concentración bacteriana con la siguiente relación:

$$OD_{600} \text{ de } 1.0 = 8 \times 10^8 \text{ células/mL.}$$

Según lo anterior para un valor de densidad óptica de 1.0 se tienen 8×10^8 células/mL. Haciendo una regla de tres con el valor de OD que se obtenga del espectrofotómetro y la relación anteriormente mencionada se puede saber cuántas bacterias hay en una muestra determinada para un determinado valor de densidad óptica.

Para cuantificar el número de células bacterianas se utiliza una microplaca de 96 pozos (Ver anexo C) que consta de 8 filas identificadas desde la letra A hasta la letra H y por 12 columnas que van del número 1 al 12, y son medidas en un espectrofotómetro a una absorbancia de 600 nm. Todos los ajustes se realizan por triplicado para cada una de las muestras con el fin de que los datos sean reproducibles.

Para que los datos tengan reproducibilidad, el llenado en la microplaca por tubo se hace por triplicado (Tabla 3). Partiendo con la concentración 1×10^7 células/mL y por la fila A desde la posición A1 hasta la posición A3 son las muestras tomadas del tubo de 30 segundo y 4 watts, de la posición A4 hasta la posición A6 son las muestras tomadas del tubo de 90 segundos y 4 watts y de la posición A7 hasta A10 son las muestras tomadas del tubo de 180 segundos y 4 Watts. Al finalizar con los tubos rotulados a 4 Watts y diferentes tiempo se pasan a los tubos rotulados a 7 y 10 Watts repitiendo el procedimiento descrito anteriormente. Cada toma de dato se hace por triplicado y por cada tubo.

Los pozos que tienen C+ son los tubos con el control positivo para este experimento. Dicho control positivo es el punto de comparación con respecto a los otros tubos para saber cuantas bacterias crecieron y cuantas dejaron de crecer sin haber hecho incidencia del láser infrarrojo sobre el control positivo (C+).

Tabla 3. Disposición en la microplaca de las muestras tomadas de los tubos con bacteria a potencias y tiempos diferentes para concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 bacterias/mL.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	30s (4w)	30s (4w)	30s (4w)	90s (4w)	90s (4w)	90s (4w)	180s (4w)	180s (4w)	180s (4w)	30s (7w)	30s (7w)	30s (7w)
B	90s (7w)	90s (7w)	90s (7w)	180s (7w)	180s (7w)	180s (7w)	30s (10w)	30s (10w)	30s (10w)	90s (10w)	90s (10w)	90s (10w)
C	180s (10w)	180s (10w)	180s (10w)	C+	C+	C+						
D	30s (4w)	30s (4w)	30s (4w)	90s (4w)	90s (4w)	90s (4w)	180s (4w)	180s (4w)	180s (4w)	30s (7w)	30s (7w)	30s (7w)
E	90s (7w)	90s (7w)	90s (7w)	180s (7w)	180s (7w)	180s (7w)	30s (10w)	30s (10w)	30s (10w)	90s (10w)	90s (10w)	90s (10w)
F	180s (10w)	180s (10w)	180s (10w)	C+	C+	C+						
G												
H												

La tabla 3 muestra la disposición en la microplaca de las muestras tomadas para cada uno de los tubos contaminados con bacteria a potencias y tiempos diferentes. Para la primera replica la toma de datos se hace por triplicado con el fin de que los datos sean reproducibles.

Las tablas 4, 5 y 6 explican como es la recolección de datos para los distintos ensayos a potencias y tiempos variables.

Tabla 4. Recolección de datos para potencia de 4 Watts y tiempos de 30, 90 y 180 segundos.

Ensayo a 4W								
30 segundos			90 segundos			180 segundos		
Dato 1	Dato 2	Dato 3	Dato 1	Dato 2	Dato 3	Dato 1	Dato 2	Dato 3

Para la tabla 4 los datos a 30 segundos corresponden a las muestras tomadas por triplicado del tubo a este tiempo y a 4 Watts de potencia.

Para 90 segundos y 4 Watts los 3 datos corresponden a las muestras tomadas por triplicado del tubo rotulado a estas condiciones.

Para 180 segundos y 4 watts los 3 datos corresponden a las muestras tomadas por triplicado del tubo rotulado a estas condiciones.

Para las tablas 5 y 6 la recolección de datos se hace de la misma manera que como se explicó para la tabla 4.

Tabla 5. Recolección de datos para potencia de 7 Watts y tiempos de 30, 90 y 180 segundos.

Ensayo a 7W								
30 segundos			90 segundos			180 segundos		
Dato 1	Dato 2	Dato 3	Dato 1	Dato 2	Dato 3	1	2	3

Tabla 6. Recolección de datos para potencia de 10 Watts y tiempos de 30, 90 y 180 segundos.

Ensayo a 10W								
30 segundos			90 segundos			180 segundos		
Dato 1	Dato 2	Dato 3	Dato 1	Dato 2	Dato 3	Dato 1	Dato 2	Dato 3

2.6 INCIDENCIA DEL LÁSER INFRARROJO

Luego de tener los tubos de ensayos listos y rotulados se realiza el montaje con el que se hará incidir el equipo de láser infrarrojo a las muestras contaminadas con la bacteria.

2.7 MONTAJE EXPERIMENTAL

El montaje para el tratamiento de las muestras contaminadas se realiza en el laboratorio de la Universidad de Cartagena donde se cuenta con todos los equipos necesarios para tal fin, se preparan las muestras, se dejan por un tiempo de 24 horas para observar su comportamiento y pasado este tiempo mediante la utilización del equipo de luz láser (Imagen 6) se realiza la incidencia de luz para posteriormente observar su efecto sobre las muestras contaminadas.

Imagen 5 . Montaje experimental con los tubos de ensayo y el equipo láser infrarrojo.



2.8 LECTURA FINAL DENSIDAD OPTICA

Pasadas las 24 horas en las que se presenta el crecimiento de la bacteria se toma el valor de densidad optica con ayuda del espectrofotómetro y se compara el valor obtenido con el valor inicial lo cual permitirá observar el comportamiento de crecimiento de las bacterias, este comportamiento determina el impacto de la utilización de la luz láser en la inhibición de la bacteria estudiada.

2.9 EQUIPOS

2.9.1 Láser Infrarrojo: Se trabaja con un equipo Wiser Láser evolution utilizado en odontología para tratamientos de dolor y descontaminación de bacterias en boca. Dentro de sus ventajas están que es un equipo que ofrece tratamientos rápidos, de menor dolor para el paciente, recuperación rápida, en otras palabras, un equipo amigable para el paciente comparado con los métodos convencionales para tratar casos como periodoncia, endodoncia, blanqueamiento, cirugía y bioestimulación. Este equipo cuenta con una longitud de onda de 980 nm y potencias variables que van desde 0 hasta los 16 watts dependiendo el uso que se le quiera dar al equipo. Tiene un peso de 1,85 kg y un tamaño de 161x208x176mm. (Imagen 7).

Imagen 6. Equipo odontológico Wiser Láser infrarrojo de alta potencia con potencia máxima de 16 watts y longitud de onda de 980 nm utilizado en la desinfección de muestras de agua contaminadas.



2.9.2 Autoclave. La autoclave es un equipo que se usa para esterilizar el material con el que se va a trabajar en el laboratorio usando el vapor de agua a altas presiones y temperaturas (Imagen 8). El tiempo de esterilizado es de 20 minutos y el de secado de 30 minutos. Se esteriliza todo el material con que se vaya a trabajar para asegurar las condiciones de asepsia adecuadas y que no se presenten contaminaciones posteriores por los materiales usados.

Imagen 7. Equipo de autoclave usado para la esterilización de materiales y caldos nutritivos.



2.9.3 Horno de Secado. Es un equipo utilizado para secar y esterilizar material de vidrio y metálico (Imagen 9). La temperatura de secado es variable de acuerdo a que tan rápido se necesite el material. En condiciones normales se trabaja el horno a 65°C secando 1 día, o si se prefiere a una temperatura de 120°C para que esté listo el material en 2 horas.

Imagen 8. Horno de secado utilizado para secar los materiales previamente esterilizados en la autoclave.



Fuente: “Estufa de secado u Horno de secado”.
http://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=10092

2.9.4. Incubadora. La incubadora se usa para hacer crecer microorganismos a determinadas condiciones de humedad y temperatura (Imagen 10). Brinda las condiciones necesarias para que las bacterias crezcan. Para la *E. coli* la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C.

Imagen 9. Incubadora utilizada para cultivar las cepas de *E. coli*.



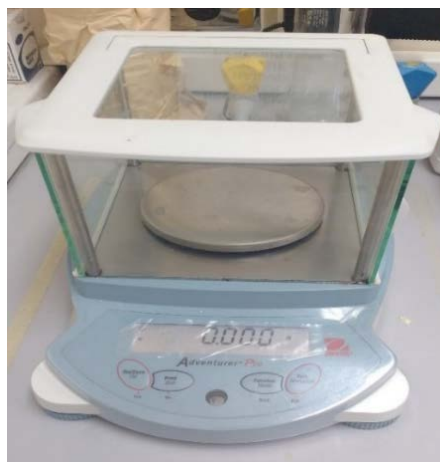
2.9.5 Agitador Vórtex. El agitador o mezclador tipo vórtex es un dispositivo que permite agitar tubos pequeños que contengan líquidos (Imagen 11). Se hace vórtex con el fin de homogenizar el líquido, y en el caso de las muestras con bacterias que no queden sedimentadas.

Imagen 10. Agitador Vórtex empleado para homogeneizar las muestras contaminadas con bacteria.



2.9.6 Balanza analítica. Es un equipo que tiene como función proporcionar un pesaje exacto gracias a su alta sensibilidad (Imagen 12). En ella se pesan los reactivos que se vayan a trabajar en el laboratorio como por ejemplo los agares nutritivos. La imagen 7 muestra la balanza usada para el pesaje de los reactivos.

Imagen 11. Balanza analítica para pesar los reactivos utilizados en la preparación de los agares y caldos nutritivos.



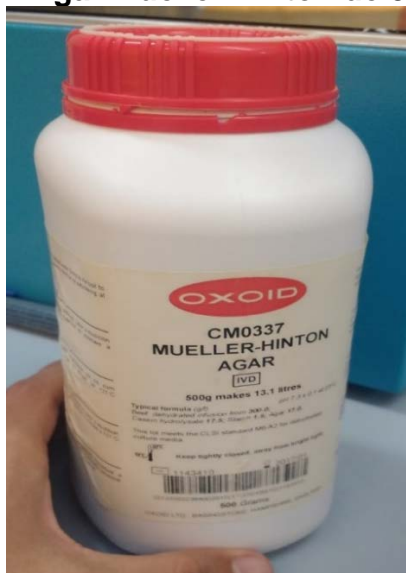
2.10 MATERIALES

Los materiales utilizados para la experimentación en el laboratorio fueron tubos de ensayo de 20 ml y 8 ml, cajas de Petri, micropipetas, puntas de micropipetas, pipetas, pipeteadores, Erlenmeyer, microplaca para espectofotómetro.

2.11 REACTIVOS

2.11.1 Agar Mueller Hinton. Es un medio de cultivo utilizado para pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (Imagen 13). Es un medio de cultivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Para su preparación se tienen en cuenta la relación que dice que por 1 litro de agua se pesan 37 gramos de agar²¹.

Imagen 12. Agar Mueller Hinton de 500g OXOID.

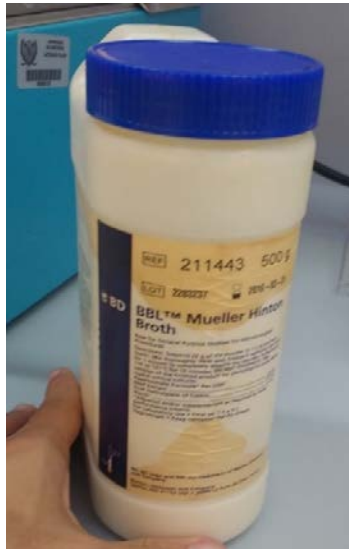


2.11.2 Caldo Mueller Hinton. Es un medio de uso general que se usa para el cultivo de una gran variedad de microorganismos (Imagen 14). Para su preparación se tiene en cuenta la relación que dice que por cada litro de agua se agregan 22 gramos de caldo²².

²¹ PA-254032.08 Rev.: Febrero 2017. INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN PLACA LISTOS PARA USAR. [1]:

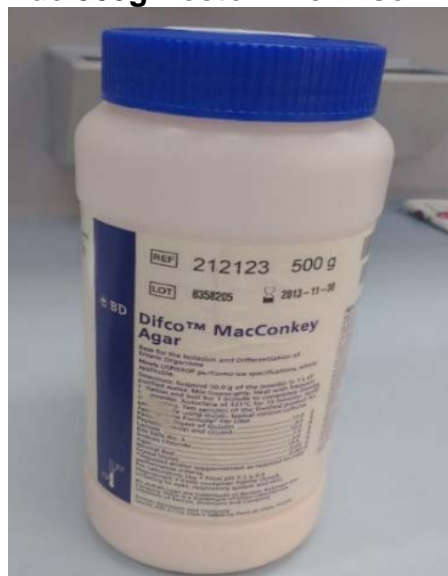
²² PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD. B BBL Mueller Hinton Broth Y. [1]:

Imagen 13. Caldo Mueller Hinton de 500g Becton Dickinson.



2.11.3 Agar MacConkey. Es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos (Imagen 15). Para prepararlo se suspenden 50 g del polvo en 1L de agua.²³

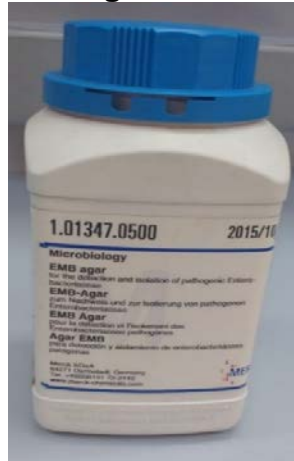
Imagen 14. Agar MacConkey de 500g Becton Dickinson.



²³USO PREVISTO, *et al.* BD MacConkey II Agar. [1]:

2.11.4 Agar EMB. Es un medio ligeramente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de bacilos Gram negativos entéricos (Enterobacteriaceae y diversos otros bacilos Gram negativos) a partir de muestras clínicas²⁴ (Imagen 15).

Imagen 15. Agar EMB de 500g de Merck.



2.12 CEPAS

2.12.1 Cepa comercial. La cepa que se usó para el desarrollo experimental fue una cepa comercial de *Escherichia coli* ATCC 25922 que se obtuvo del cepario que tiene el laboratorio de microbiología clínica y ambiental de la Universidad de Cartagena. Es una cepa de *E.coli* que se encuentra normalmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y de animales de sangre caliente que se usa como indicador de contaminación en alimentos y en agua.

2.12.2 Cepa clínica. La cepa clínica que se trabajó proviene de un aislamiento positivo en hemocultivo de una paciente que presentaba una enfermedad de infección urinaria. De acuerdo al perfil fenotípico de resistencia de la cepa 1748 se observa que es bastante resistente a determinados antibióticos.

2.12.3 Cepa de alimento. La cepa de alimento que se trabajó en las pruebas experimentales viene de un aislamiento que se hizo a una hamburguesa proveniente de un puesto de comidas rápidas callejero.

El desarrollo de este capítulo es importante puesto que en él se pautan los pasos a seguir para un adecuado desarrollo experimental, así como la descripción de los equipos utilizados en el laboratorio y las características de cada una de las cepas que se trabajaron para la evaluación del método por láser infrarrojo.

²⁴USO PREVISTO BD EMB Agar and Modified (fórmula de Holt-Harris y Teague). BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. [1]:

3. ANALISIS Y RESULTADOS

La finalidad de este capítulo es analizar el comportamiento de las muestras contaminadas (con cepa comercial, clínica y de alimentos) al someterlas al proceso de desinfección por el método de láser infrarrojo para poder determinar el experimento que presenta el mejor comportamiento a las distintas potencias y tiempos utilizados.

3.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS CEPA ATCC 25922

Se hace una primera corrida con la cepa comercial ATCC 25922 con el fin de determinar si el método propuesto tiene efecto sobre la disminución en la concentración final de cada tubo. Las pruebas se hicieron en medio nutritivo por lo que se obtiene un crecimiento mayor comparado con el crecimiento en agua. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos a las 24 horas de la incidencia de láser infrarrojo sobre las muestras contaminadas con *E.coli* que sirven para determinar la cantidad de bacterias que crecieron en cada una de las muestras. Se comparan estos crecimientos con respecto al control positivo (C+) que es un tubo contaminado con bacteria al cual no se le hace incidencia del láser para determinar si el método tiene efecto en el crecimiento bacteriano.

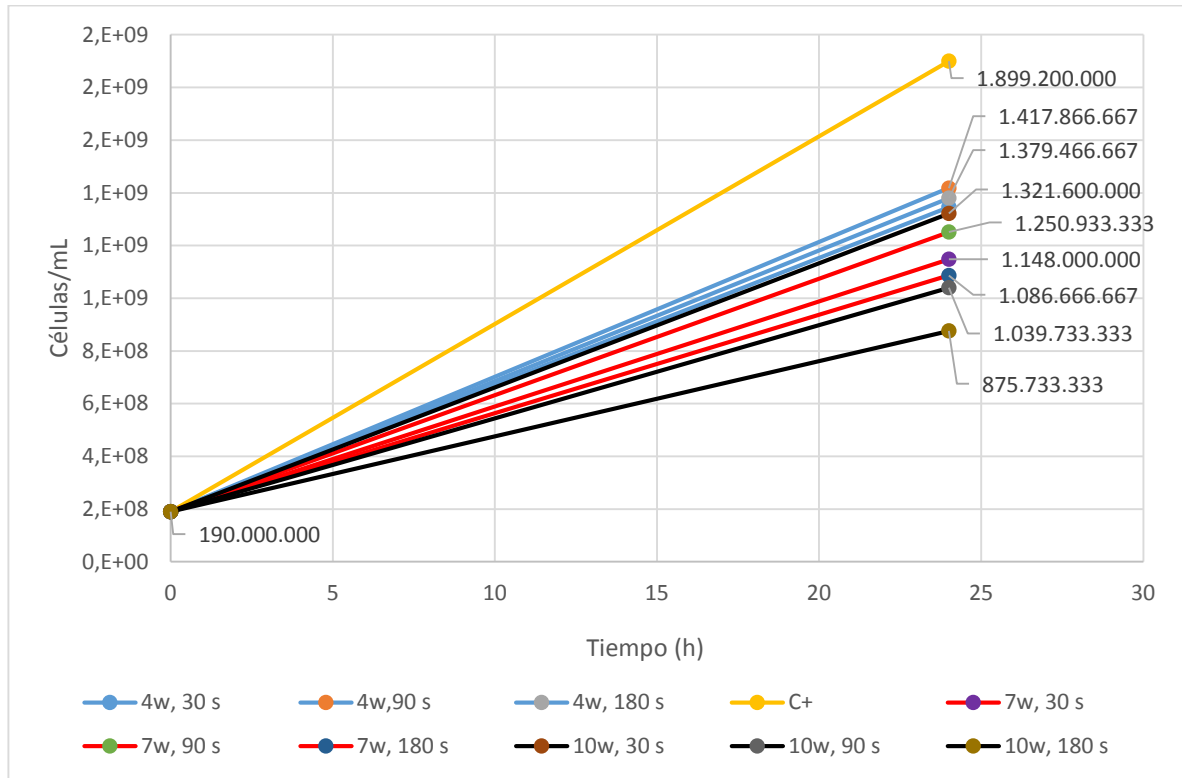
La concentración inicial para cada uno de los tubos es de 190.000.000 células/mL equivalente a un valor de densidad óptica de 0,238. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos a las 24 horas del crecimiento bacteriano para la primera corrida.

Tabla 7. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para la cepa ATCC 25922 para la primera prueba experimental en el laboratorio.

Densidad Óptica				Células/mL			
	4 W	7 W	10 W		4 W	7 W	10 W
30 s	1,682	1,435	1,652	30 s	1.345.866.667	1.148.000.000	1.321.600.000
90 s	1,772	1,563	1,299	90 s	1.417.866.667	1.250.933.333	1.039.733.333
180 s	1,724	1,358	1,094	180 s	1.379.466.667	1.086.666.667	875.733.333
C+	2,374	2,374	2,374	C+	1.899.200.000	1.899.200.000	1.899.200.000

Con los datos de la tabla 7 se realiza la gráfica 1, la cual sirve para hacer un análisis y comparar la concentración inicial contra la final en cada uno de los tubos contaminados con *E. coli*.

Gráfica 1. Grafica de crecimiento bacteriano entre la concentración inicial y la concentración final en cada una de las muestras.



La gráfica 1 relaciona la concentración inicial en todos los tubos comparados con el crecimiento final para cada muestra. Las líneas azules corresponden a la potencia de 4 watts, las rojas a 7 watts y las negras a 10 watts. Como se puede observar a 4 watts y a los diferentes tiempos no hay mucha diferencia en la concentración final, pues la concentración final para estos ensayos esta entre 1.345.866 y 1.417.866 células/mL, lo que quiere decir que a esa potencia y esos tiempos no hay un efecto significativo sobre la concentración final. A las potencias de 7 y 10 watts ya se aprecia una variación significativa en la concentración, además que también se observa que a mayor tiempo de exposición la concentración final se reduce, por lo que se deduce que a los tiempos de 30 y 90 segundos el experimento no fue bueno, pero a tiempos superiores a 180 ya se aprecia un cambio.

Teniendo en cuenta estos resultados se decide modificar los tiempos y las potencias para el experimento. Para los tiempos se toman valores de 180 y 270 segundos y para la potencia 7 y 10 watts, por lo que el diseño de experimento cambia de un modelo 3^2 a uno 2^2 . La cepa de *E. coli* para los experimentos ya no será la comercial 25922 sino una cepa de *E. coli* clínica y otra de alimentos debido a que si con una cepa control (25922) se presentó una disminución en la concentración bacteriana, con las otras dos cepas que presentan un perfil de resistencia alto se espera que el láser infrarrojo tenga algún efecto sobre la concentración. Además se decide

cambiar el medio en el que se harán los inóculos bacterianos, ya no se usará caldo Mueller Hinton sino agua Milli-Q doblemente estéril con el fin de que la experimentación sea lo más real posible.

3.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA CEPA CLÍNICA Y ALIMENTOS

Con los resultados obtenidos a las 24 horas de crecimiento de cada cepa se evalúa el efecto que se obtiene en el crecimiento de cada uno de los experimentos con respecto al control positivo (C+) que no tuvo incidencia del láser infrarrojo. Se realiza el análisis para cada una de las réplicas hechas calculando cuantas bacterias crecieron en cada uno de los tubos y cuál fue el comportamiento del tubo al que no se le hizo tratamiento con el equipo de láser (C+).

Para distinguir que valores son de la cepa clínica y de alimentos los datos de color azul corresponden a los de la cepa clínica y los de color rojo a la de alimentos.

3.3 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA CLÍNICA

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para las tres replicas hechas con la cepa clínica.

3.3.1 Primera Réplica. Para la primera replica la tabla 8 muestra los valores de densidad óptica (color azul) a las 24 horas de realizado el tratamiento. Con estos datos se calcula la cantidad de bacteria que creció en cada muestra expresado en células/mL.

Tabla 8. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos.

	7 Watts						10 Watts					
	180 segundos			270 segundos			180 segundos			270 segundos		
Cepa clínica	0,272	0,282	0,286	0,261	0,273	0,269	0,232	0,283	0,326	0,277	0,245	0,313
Cepa alimento	0,259	0,269	0,295	0,214	0,218	0,225	0,218	0,246	0,246	0,225	0,23	0,227

Con los datos obtenidos de la tabla 8 se realiza la tabla 9, la cual muestra los promedios para cada experimento y la conversión de las medidas de densidad óptica a células/mL para saber cuántas bacterias crecieron en cada muestra pasadas las 24 horas.

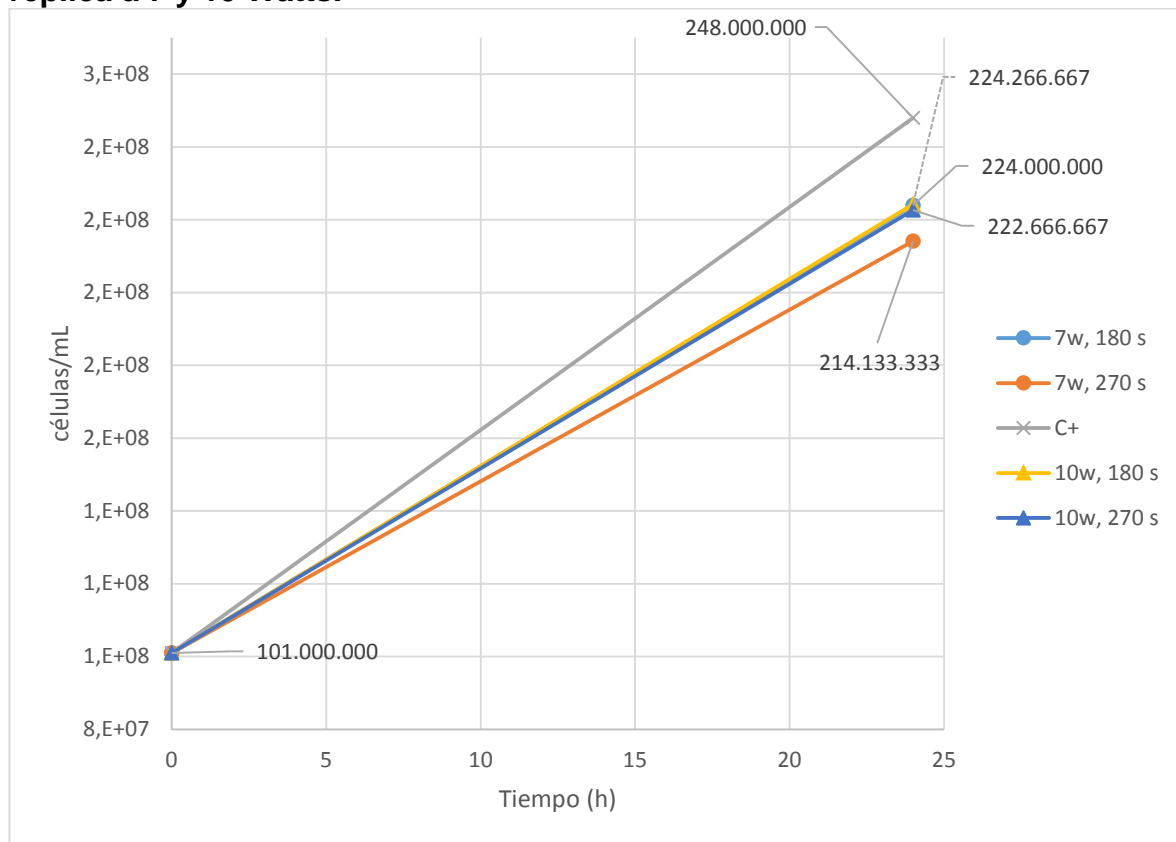
Tabla 9. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a Células/mL.

Bacterias a las 24 Horas (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,28	0,283	180 s	224.000.000	224.266.666
270 s	0,267	0,278	270 s	214.133.333	222.666.666
C+	0,31	0,31	C+	248.000.000	248.000.000

La conversión de densidad óptica a UFC/ml se hace haciendo una regla de tres donde un valor de 1.0 en densidad óptica equivale a 8×10^8 células/ml. Siendo así para saber cuántas Células/mL hay por valor de densidad óptica se multiplica el 8×10^8 células/mL por el valor de OD que se obtenga en cada una de las muestras. Siguiendo estos pasos es como se obtiene los valores de la tabla 9.

Teniendo el valor de concentración inicial de las muestras y el valor de concentración final se grafican estos datos para observar con respecto al control positivo cuanto creció de bacteria y el efecto que tienen los tiempos y las potencias sobre el crecimiento bacteriano (Gráfica 2).

Gráfica 2. Comparación entre la concentración inicial y final para la 1ra réplica a 7 y 10 Watts.



Todas las muestras, incluido el control positivo (C+) comienzan con una concentración inicial de 101.000.000 UFC/mL. Después de 24 horas el control positivo no se sometió al efecto de láser infrarrojo, por lo cual presentó un crecimiento normal con respecto a las otras muestras que si fueron sometidas al método de desinfección. De acuerdo a la gráfica 1 si las muestras son expuestas al láser infrarrojo presentan una disminución en la concentración final con respecto al control positivo, por lo cual se infiere que el láser tiene efecto sobre el crecimiento bacteriano.

Entre la potencia y el tiempo la variable que presenta un efecto significativo sobre la variable de respuesta (Concentración bacteriana) es el tiempo de incidencia. Como se observa en la gráfica 1 no hay diferencia entre usar potencias de 7 o 10 watts pues las concentraciones a esas potencias fueron muy cercanas, pero al aumentar el tiempo si se ve una disminución en la concentración de bacterias.

Con los valores de la tabla 9 se obtiene la cantidad de bacteria que creció entre las 0 horas y las 24 horas para cada una de las muestras restando el valor de las 24 horas menos el de las 0 horas. La tabla 10 ilustra los resultados obtenidos al realizar la operación descrita anteriormente para cada una de las muestras.

Tabla 10. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas.

Bacterias que crecieron (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,154	0,154	180 s	123.200.000	123.466.666
270 s	0,141	0,152	270 s	113.333.333	121.866.666
C+	0,184	0,184	C+	147.000.000	147.000.000

Nota: para todas las réplicas, sean de cepa clínica o de alimentos se siguen los pasos y operaciones descritas anteriormente.

3.3.2 Segunda Réplica. La segunda réplica se realizó el día siguiente a la primera réplica, simulando todas las condiciones y manejando el mismo valor de concentración inicial para todas las muestras. La tabla 11 muestra los valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento.

Tabla 11. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, segunda réplica.

	7 Watts						10 Watts					
	180 segundos			270 segundos			180 segundos			270 segundos		
Cepa clínica	0,278	0,267	0,316	0,249	0,256	0,261	0,246	0,247	0,249	0,201	0,205	0,202
Cepa de alimentos	0,206	0,204	0,214	0,192	0,194	0,196	0,19	0,196	0,195	0,187	0,188	0,185

Con los valores de la tabla 11 se calculan los promedios para cada una de las muestras como se hizo en la primera replica, obteniendo los resultados de la tabla 12.

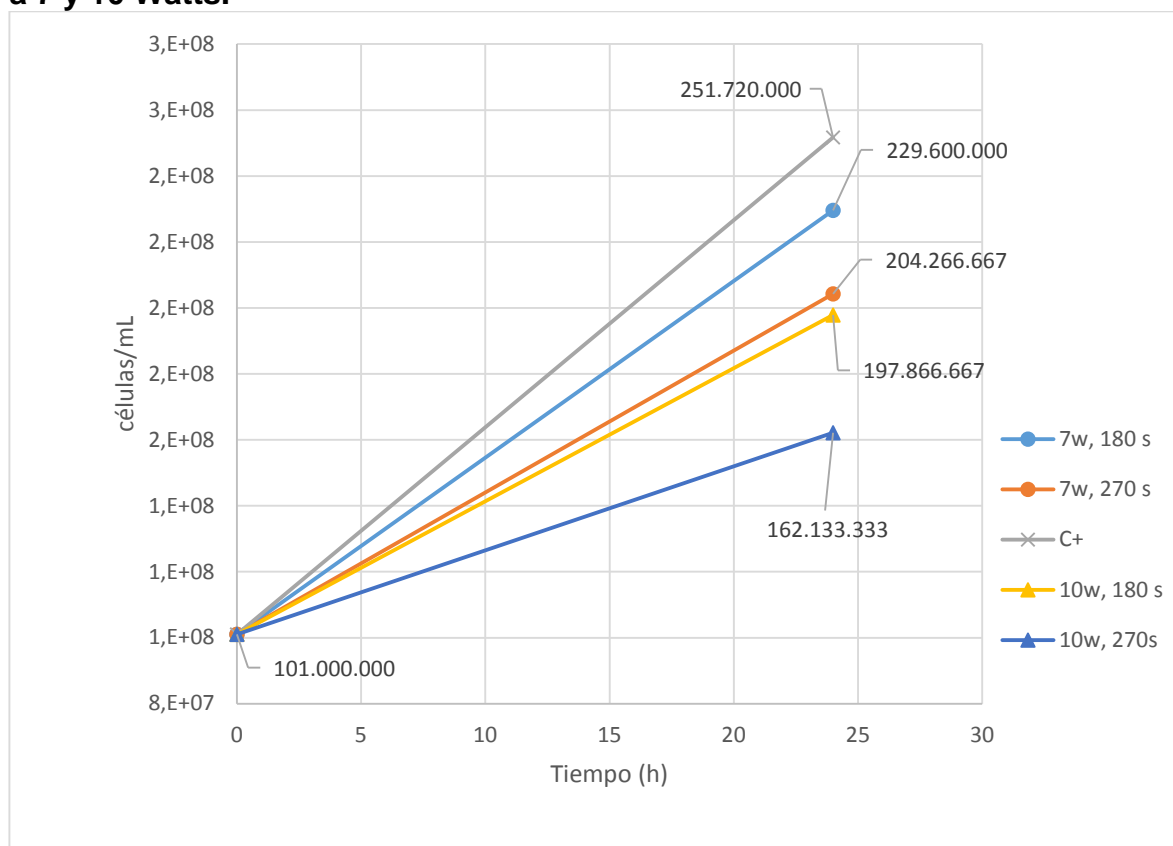
Tabla 12. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a células/mL, segunda réplica

Bacterias a las 24 horas (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,287	0,247	180 s	229.600.000	197.866.667
270 s	0,255	0,202	270 s	204.266.667	162.133.333
C+	0,314	0,314	C+	251.720.000	251.720.000

Los datos de la tabla 12 y el valor de la concentración inicial para todas las muestras se grafican para poder hacer el análisis del efecto que tiene el tiempo y la potencia sobre la concentración bacteriana final.

La gráfica 3 permite hacer el análisis del efecto que tiene el tiempo y la potencia sobre la concentración final en cada muestra.

Gráfica 3. Comparación entre concentración inicial y final para la 2da replica a 7 y 10 Watts.



Como se observa en la gráfica 3 para el tiempo 180 segundos y potencia 7 watts la concentración final es mayor con respecto a la de 270 segundos y potencia 7 watts, es decir que a mayor tiempo de exposición menor será el crecimiento bacteriano. Lo mismo sucede para la potencia de 10 watts, a mayor tiempo de exposición la concentración final será menor, siendo el tiempo la variable que más influye sobre la concentración final.

Utilizando los datos de la tabla 12 y el valor de la concentración inicial de las muestras se puede calcular cuantas bacterias crecieron en el lapso de 0 a 24 horas. Esto se hace restando el valor de las 24 horas menos el de las 0 horas. La tabla 10 ilustra los resultados obtenidos al realizar la operación descrita anteriormente para cada una de las muestras.

Tabla 13. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas. Segunda réplica.

Bacterias que crecieron (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,161	0,121	180 s	128.800.000	97.066.667
270 s	0,129	0,0767	270 s	103.466.667	61.333.333
C+	0,188	0,188	C+	150.920.000	150.920.000

3.3.3 Tercera Replica. Para la tercera replica se siguen los mismos pasos que en las réplicas anteriores. La tabla 14 muestra los valores de densidad óptica a las 24 horas.

Tabla 14. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, tercera réplica.

	7 Watts						10 Watts					
	180 segundos			270 segundos			180 segundos			270 segundos		
Cepa clínica	0,316	0,314	0,321	0,273	0,294	0,327	0,446	0,207	0,227	0,203	0,243	0,237
Cepa de alimentos	0,222	0,234	0,232	0,197	0,2	0,202	0,251	0,201	0,191	0,183	0,206	0,17

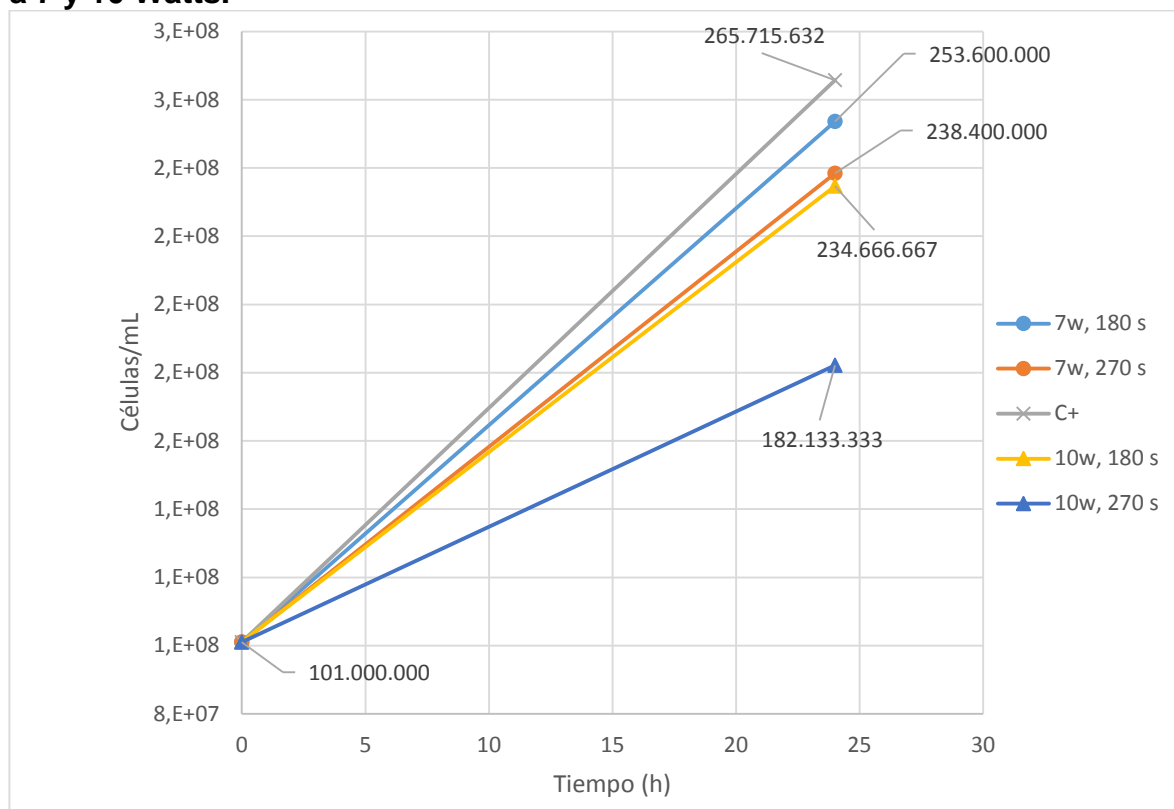
Con estos valores de densidad óptica se calcula el promedio para cada una de las muestras para saber cuál es la concentración a las 24 horas para cada experimento.

Tabla 15. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a células/mL. Tercera réplica.

Bacterias a las 24 horas (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,317	0,293	180 s	253.600.000	234.666.667
270 s	0,298	0,227	270 s	238.400.000	182.133.333
C+	0,319	0,319	C+	265.715.632	265.715.632

Para evaluar el efecto del tiempo y la potencia sobre el crecimiento bacteriano se usan los datos de la tabla 15 y el valor de la concentración inicial. La gráfica 4 muestra la relación de estas variables y como afecta la variable de respuesta (concentración final).

Gráfica 4. Comparación entre concentración inicial y final para la 3ra replica a 7 y 10 Watts.



La grafica 4 muestra la tendencia que se está presentando que a mayor tiempo de incidencia sobre una muestra su crecimiento es menor con respecto al de menor tiempo. Para la potencia de 7 watts la que tuvo el menor crecimiento fue la de 270 segundos con una concentración de 238.400.000 Células/mL mientras que la de 180 segundos a la misma potencia su concentración fue de 253.600.000 Células/mL. Para la potencia de 10 watts sucede lo mismo, la muestra que tiene mayor tiempo de exposición tiende a presentar un crecimiento menor con respecto a la que tiene menos tiempo de incidencia que tiene un crecimiento mayor.

Los datos de la tabla 15 junto con el valor de concentración inicial para cada muestra permiten determinar la cantidad de bacterias que crecieron en el lapso de tiempo de 0 a 24 horas.

Tabla 16. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas. Tercera réplica.

Bacterias que crecieron (Células/mL)					
Densidad Óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,191	0,167	180 s	152.800.000	133.866.667
270 s	0,172	0,101	270 s	137.600.000	81.333.333
C+	0,193	0,193	C+	160.883.632	160.883.632

3.4 PROMEDIO RESULTADOS DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA CLÍNICA

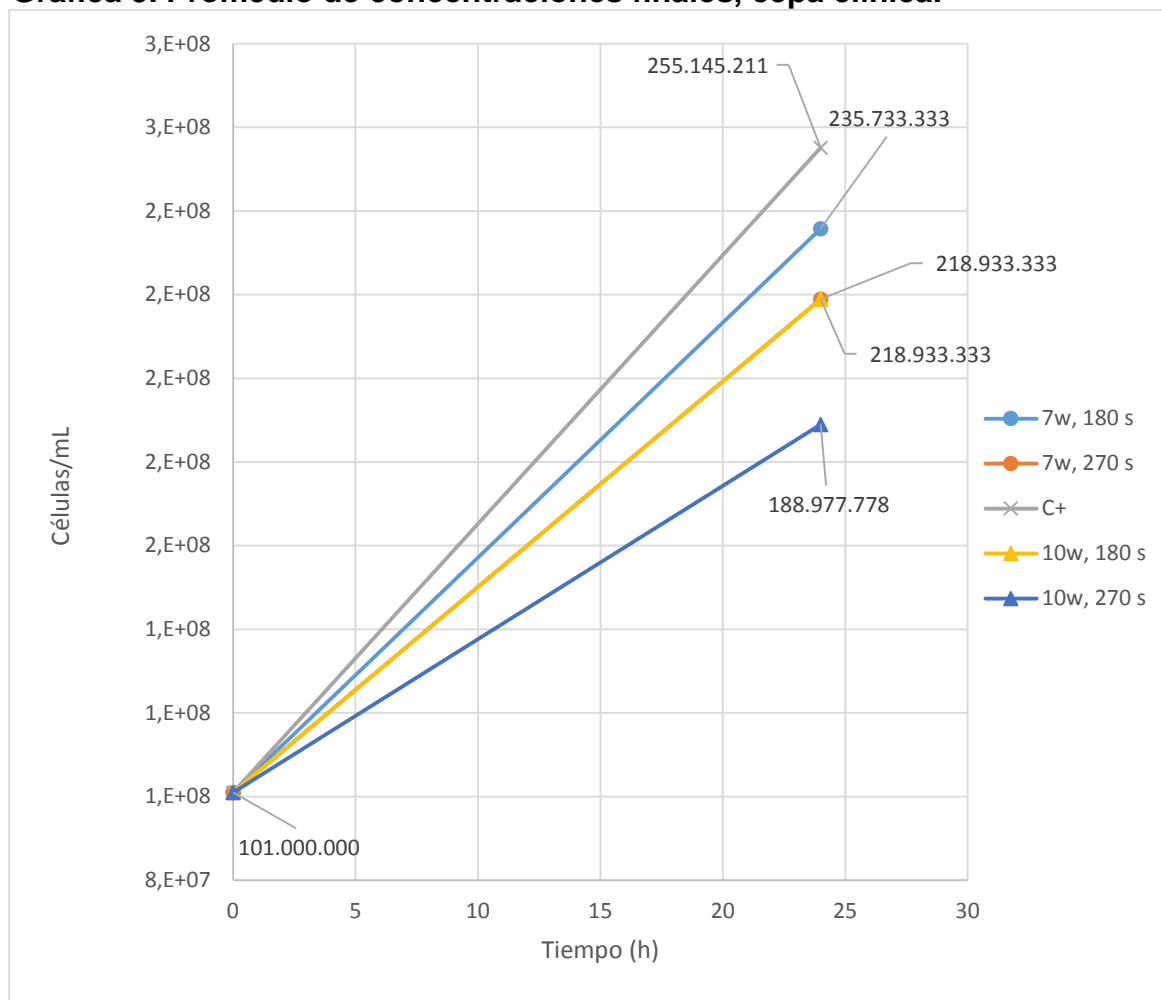
Para corroborar que la tendencia que se presenta en las 3 réplicas del crecimiento bacteriano de la cepa clínica es correcta se hace un promedio entre las tres replicas realizadas. Se suman los valores de concentración de 7 watts y 180 segundos de las corridas, luego se suman las concentraciones de 7 watts y 270 segundos y lo mismo se hace con los valores de 10 watts. La tabla 14 muestra los promedios realizados teniendo en cuenta las tres replicas.

Tabla 17. Promedios de concentraciones finales para la cepa clínica.

Promedio concentraciones finales cepa clínica (Células/mL)		
Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	235.733.333	218.933.333
270 s	218.933.333	188.977.778
C+	255.145.211	255.145.211

Una vez se calculen los promedios se grafican todos los valores con respecto a la concentración inicial (101.000.000 células/mL) para evaluar el efecto que tiene el tiempo y la potencia sobre la concentración final de bacteria.

Grafica 5. Promedio de concentraciones finales, cepa clínica.



La grafica 5 muestra la tendencia que se presenta en las réplicas anteriormente mencionadas sobre la disminución de la concentración bacteriana a medida que se aumenta el tiempo de exposición. Para 7 watts a menor tiempo mayor concentración de bacteria final y para 10 watts sucede lo mismo. En este caso dos medidas dieron el mismo valor de concentración que en la gráfica no es perceptible, pero para 7 watts, 270 segundos y 10 watts, 180 segundos el valor de concentración es de 218.933.333 Células/mL.

3.5 RESULTADOS DEL CRECIMIENTO DE LA CEPA DE ALIMENTOS

Los resultados del crecimiento de la cepa de alimentos se analizan de la misma forma en que se hizo con la cepa clínica.

3.5.1 Primera Réplica. En la tabla 18 se muestran los valores para densidad óptica a las 24 horas. Con estos datos se calcula la concentración final en cada una de las muestras.

Tabla 18. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos.

	7 Watts						10 Watts					
	180 segundos			270 segundos			180 segundos			270 segundos		
Cepa clínica	0,272	0,282	0,286	0,261	0,273	0,269	0,232	0,283	0,326	0,277	0,245	0,313
Cepa de alimentos	0,259	0,269	0,295	0,214	0,218	0,225	0,218	0,246	0,246	0,225	0,23	0,227

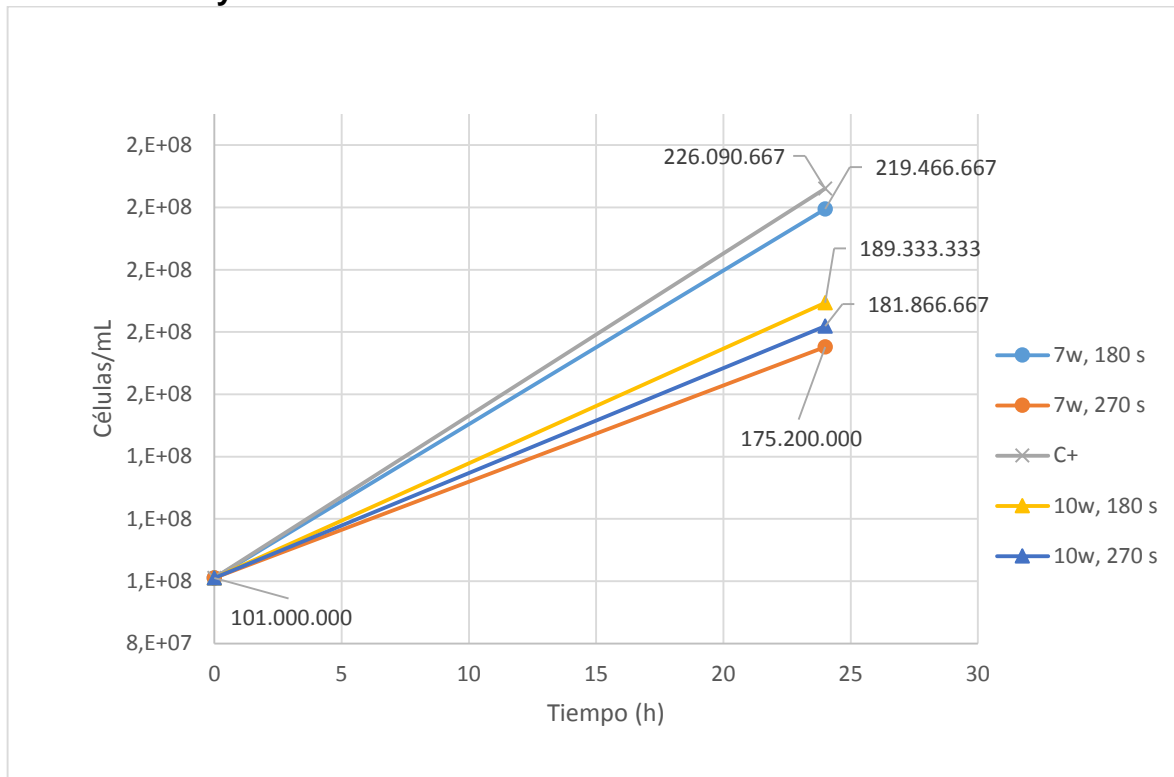
Calculando los promedios para cada muestra con los datos de la anterior tabla se obtiene la tabla 19, donde se observan las diferentes concentraciones

Tabla 19. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a Células/mL.

Bacterias a las 24 Horas (Células/mL)					
Densidad Óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,274	0,236	180 s	219.466.667	189.333.333
270 s	0,219	0,227	270 s	175.200.000	181.866.667
C+	0,282	0,282	C+	226.090.667	226.090.667

Teniendo el valor de concentración inicial de las muestras y el valor de concentración final se grafican estos datos para observar con respecto al control positivo cuanto creció y el efecto que tienen los tiempos y potencias variables sobre el crecimiento bacteriano.

Gráfica 6. Comparación concentración inicial y final 1ra replica cepa alimentos a 7 y 10 watts.



Analizando la gráfica 6 se observa que hay una tendencia a disminuir la concentración final a medida que se aumenta el tiempo de exposición en cada una de las muestras. Para el tiempo de 270 segundos y potencias de 7 y 10 watts la concentración bacteriana final es menor con respecto a las muestras que están a 180 segundos y a las potencias de 7 y 10 watts. Comparando los resultados de las concentraciones finales con el control positivo se observa que la incidencia del láser sobre las muestras de agua contaminada tiene en efecto significativo pues de no haber incidido el láser sobre las muestras las concentraciones finales estarían cercana o iguales al valor del control positivo.

Con los valores de la tabla 19 se obtiene la cantidad de bacteria que creció entre las 0 horas y las 24 horas para cada una de las muestras restando el valor de las 24 horas menos el de las 0 horas. La tabla 20 ilustra los resultados obtenidos al realizar la operación descrita anteriormente para cada una de las muestras.

Tabla 20. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas.

Bacterias que crecieron (Células/mL)					
Densidad Óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,148	0,110	180 s	118.666.667	88.533.333
270 s	0,093	0,101	270 s	74.400.000	81.066.667
C+	0,156	0,156	C+	125.290.667	125.290.667

3.5.2 Segunda Replica. La segunda replica se realizó el día siguiente a la primera replica, simulando todas las condiciones y manejando el mismo valor de concentración inicial para todas las muestras. La tabla 21 muestra los valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas.

Tabla 21. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, segunda réplica.

	7 Watts						10 Watts					
	180 segundos			270 segundos			180 segundos			270 segundos		
Cepa clínica	0,278	0,267	0,316	0,249	0,256	0,261	0,246	0,247	0,249	0,201	0,205	0,202
Cepa de alimentos	0,206	0,204	0,214	0,192	0,194	0,196	0,19	0,196	0,195	0,187	0,188	0,185

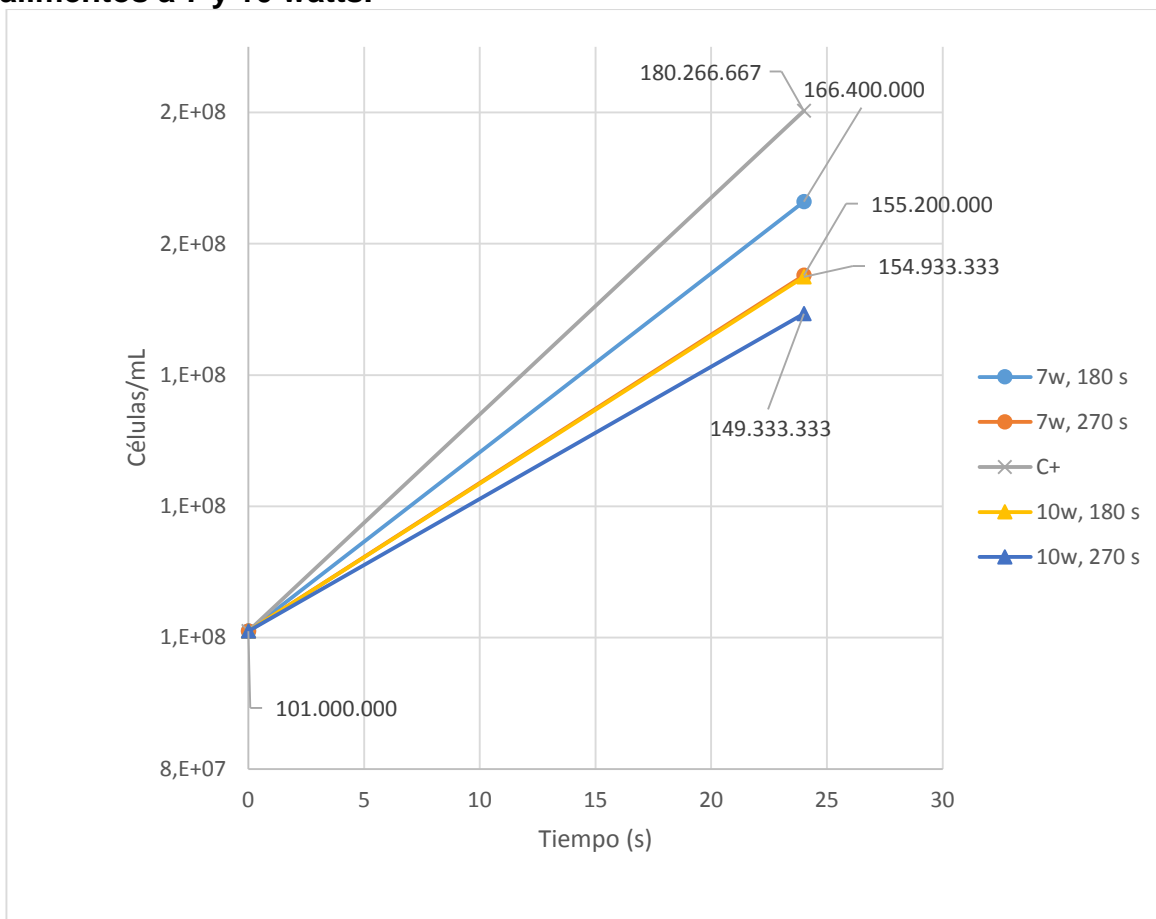
Con los valores de la tabla 21 se hacen los promedios para las concentraciones finales para cada una de las muestras como se hizo en la primera replica, obteniendo los resultados de la tabla 22.

Tabla 22. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a Células/mL. Segunda replica.

Bacterias a las 24 horas (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,208	0,193	180 s	166.400.000	154.933.333
270 s	0,194	0,186	270 s	155.200.000	149.333.333
C+	0,225	0,225	C+	180.266.667	180.266.667

Los datos de la tabla 22 y el valor de la concentración inicial para todas las muestras se grafican para poder hacer el análisis del efecto que tiene el tiempo y la potencia sobre la concentración bacteriana final.

Grafica 7. Comparación concentración inicial y final 2da replica cepa alimentos a 7 y 10 watts.



Analizando la gráfica 7 se observa que hay una disminución de la concentración final con respecto a control positivo. Se sigue presentando la tendencia de que a mayor tiempo de exposición, no importa que potencia, la concentración bacteriana final tiende a disminuir. Para este caso las muestras de 7 watts, 270 segundos y 10 watts, 180 segundos presentan una concentración muy parecida y es por esto que en el gráfico no se aprecia la diferencia entre ambas, pero que comparándolas con sus respectivas variables se puede establecer la disminución de la concentración final a mayor tiempo de exposición.

Utilizando los datos de la tabla 22 y el valor de la concentración inicial de las muestras se puede calcular cuantas bacterias crecieron en el lapso de 0 a 24 horas. Esto se hace restando el valor de las 24 horas menos el de las 0 horas. La tabla 23 ilustra los resultados obtenidos al realizar la operación descrita anteriormente para cada una de las muestras.

Tabla 23. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas. Segunda replica cepa de alimentos

Bacterias que crecieron (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10w
180 s	0,103	0,088	180 s	82.666.667	70.666.667
270 s	0,073	0,060	270 s	58.933.333	48.266.667
C+	0,111	0,111	C+	89.333.333	89.333.333

3.5.3 Tercera Replica. La tercera replica se realizó el día siguiente a la segunda replica, simulando todas las condiciones y manejando el mismo valor de concentración inicial para todas las muestras.

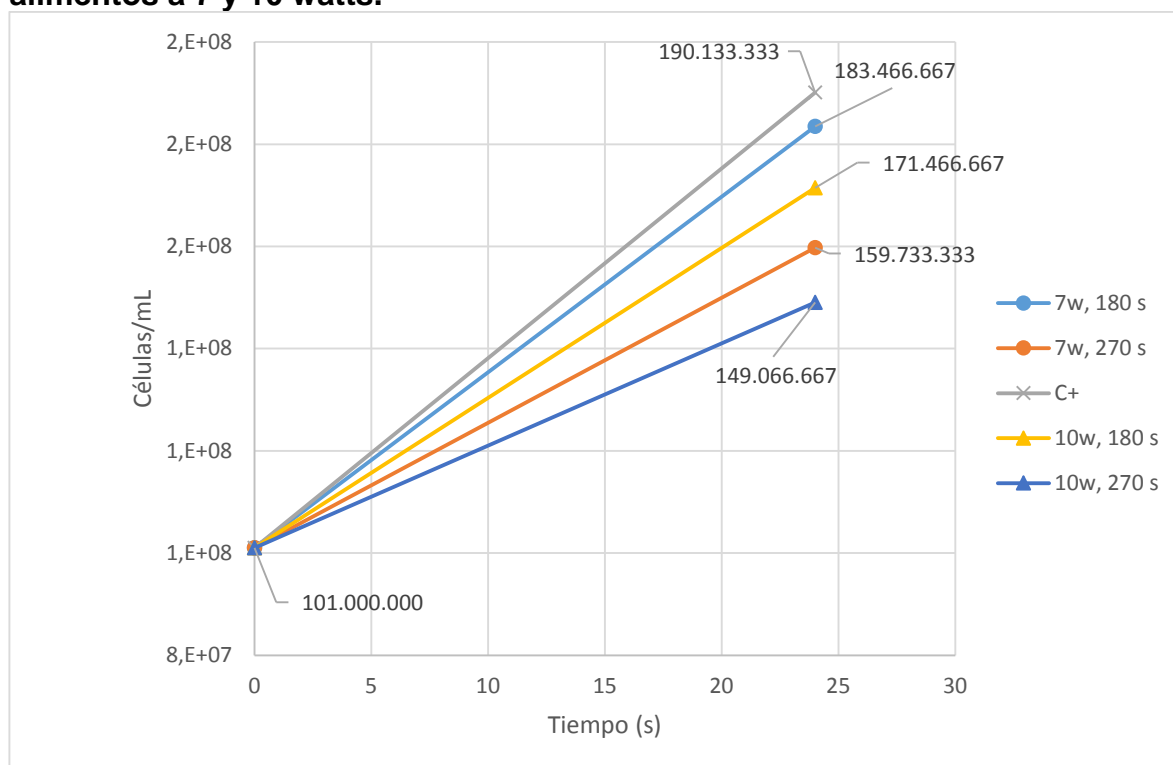
Tabla 24. Valores de densidad óptica obtenidos a las 24 horas de crecimiento para cada una de las muestras a las diferentes potencias y tiempos, tercera réplica.

	7 Watts						10 Watts					
	180 segundos			270 segundos			180 segundos			270 segundos		
Cepa clínica	0,316	0,314	0,321	0,273	0,294	0,327	0,446	0,207	0,227	0,203	0,243	0,237
Cepa de alimentos	0,222	0,234	0,232	0,197	0,2	0,202	0,251	0,201	0,191	0,183	0,206	0,17

Tabla 25. Promedios de densidad óptica para cada muestra y conversión a células/mL. Tercera replica cepa alimentos.

Bacterias a las 24 horas (Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,229	0,214	180 s	183.466.667	171.466.667
270 s	0,199	0,186	270 s	159.733.333	149.066.667
C+	0,237	0,237	C+	190.133.333	190.133.333

Gráfica 8. Comparación concentración inicial vs final 3ra replica cepa alimentos a 7 y 10 watts.



Analizando los promedios de las tres réplicas de la cepa de alimentos con respecto a la concentración inicial y al control positivo se observa que se presenta una tendencia a la disminución de la concentración final a medida que se aumenta el tiempo de incidencia para cada una de las muestras. A 7 watts y 180 segundos la concentración es mayor comparada con la misma potencia y 270 segundos, lo que deja claro que es el tiempo el factor que tiene mayor influencia sobre la variable de respuesta.

Tabla 26. Bacterias que crecieron entre las 0 horas y las 24 horas, tercera replica cepa de alimentos.

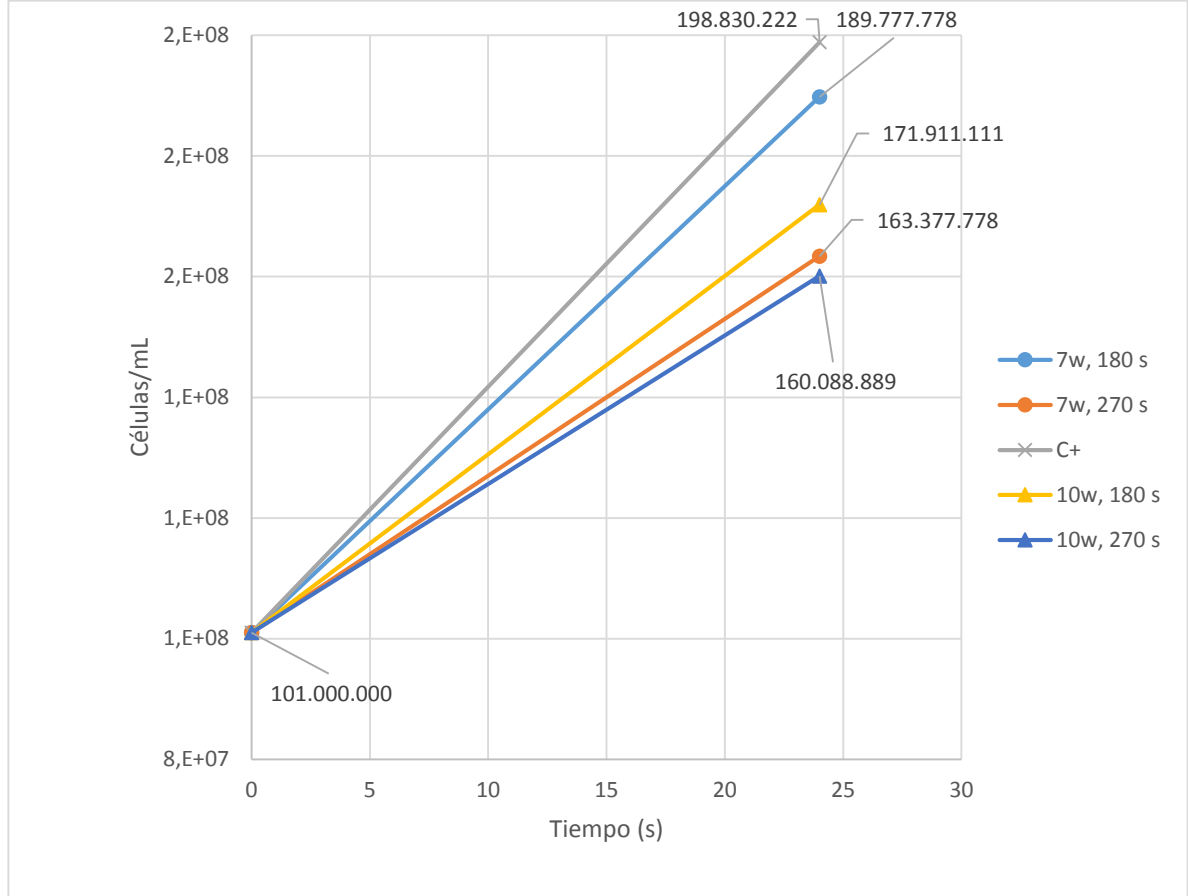
Bacterias que crecieron(Células/mL)					
Densidad óptica			Células/mL		
Tiempo/Potencia	7W	10W	Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	0,103	0,088	180 s	82.666.667	70.666.667
270 s	0,073	0,060	270 s	58.933.333	48.266.667
C+	0,111	0,111	C+	89.333.333	89.333.333

3.6 PROMEDIO RESULTADOS CEPA DE ALIMENTOS

Tabla 27. Promedios concentraciones finales cepa de alimentos

Promedio concentraciones finales cepa alimentos (Células/mL)		
Tiempo/Potencia	7W	10W
180 s	189.777.778	171.911.111
270 s	163.377.778	160.088.889
C+	198.830.222	198.830.222

Gráfica 9. Promedio de concentraciones finales cepa alimentos.



Analizando los promedios de las tres réplicas de la cepa de alimentos con respecto a la concentración inicial y al control positivo se observa que se presenta una tendencia a la disminución de la concentración final a medida que se aumenta el tiempo de incidencia para cada una de las muestras. A 7 watts y 180 segundos la concentración es mayor comparada con la misma potencia y 270 segundos, lo que deja claro que es el tiempo el factor que tiene mayor influencia sobre la variable de respuesta.

3.7 INFLUENCIA DE LAS VARIABLES TIEMPO Y POTENCIA

Para este proyecto se diseña un análisis factorial 2^2 para hacer un análisis del efecto que tienen las variables previamente establecidas (potencia y tiempo) sobre la variable de respuesta (concentración bacteriana). La variable de respuesta es el crecimiento bacteriano el cual se cuantifica en Células/mL específico para cada uno de las muestras. Se realizan 3 réplicas para cada condición experimental en los factores estudiados y los resultados obtenidos para cada una de las cepas trabajadas (clínica y de alimentos) se procesan para poder evaluar el efecto de dichos factores mediante un análisis de varianza ANOVA.

Para cada una de las réplicas se hace una diferencia entre la concentración final menos la inicial y el valor obtenido se computa en el software Statgraphics versión Centurión XVIII.

Tabla 28. Diseño factorial para la viabilidad de la *Escherichia coli* cepa clínica.

T/P	7W	10W
180 s	123.000.000	123.266.667
	128.600.000	96.866.667
	168.600.000	133.666.667
270 s	113.133.333	121.666.667
	103.266.667	61.133.333
	137.400.000	81.133.333

Tabla 29. Diseño factorial para la viabilidad de la *Escherichia coli* cepa alimentos.

T/P	7W	10W
180 s	118.466.667	88.333.333
	65.400.000	53.933.333
	82.466.667	70.466.667
270 s	74.200.000	80.866.667
	54.200.000	48.333.333
	58.733.333	48.066.667

3.8 RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE VARIANZA (ANOVA)

Para analizar el efecto que tiene el tiempo y la potencia sobre la concentración bacteriana final se realiza un análisis de varianza (ANOVA) desarrollado en el software Statgraphics versión Centurión XVI.II, el cual evalúa la importancia de factores al comparar las medias de la variable respuesta en los diferentes niveles de los factores, para declarar las posibles significancias estadísticas entre los tratamientos. La tabla 27 muestra los resultados obtenidos al realizar el ANOVA para la cepa clínica y la cepa de alimentos.

Tabla 30. Análisis ANOVA para la cepa clínica

<i>Fuente</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A: Potencia</i>	<i>0,0576</i>
<i>B: Tiempo</i>	<i>0,0576</i>
<i>AB</i>	<i>0,7369</i>
<i>bloques</i>	<i>0,1225</i>
<i>Error total</i>	
<i>Total (corr.)</i>	

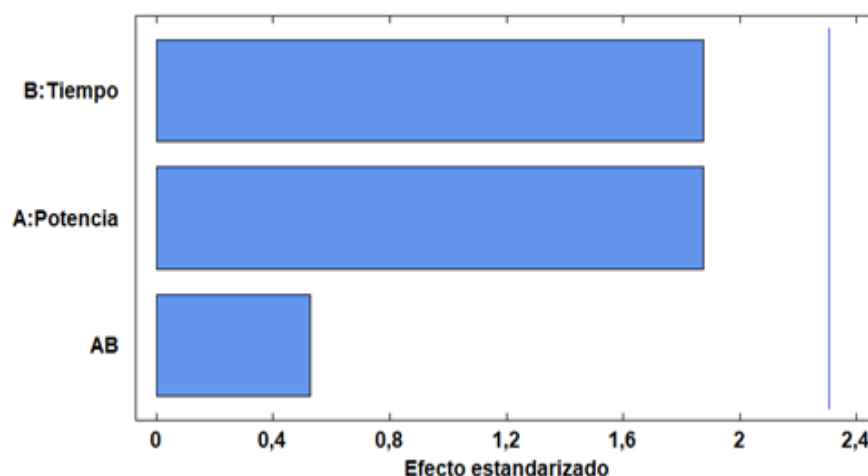
Fuente: Statgraphics versión Centurión XVI.II

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de concentración bacteriana en piezas separadas para cada uno de los efectos, entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 0 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. De acuerdo al análisis ANOVA ni la potencia ni el tiempo tienen significancia sobre la variable de respuesta, pero observando los valor-P se ve que están cercanos al 0,05 por lo cual se puede decir que los factores si tienen efecto sobre la variable de respuesta, pero no son lo suficientemente significantes.

La imagen 16 esquematiza un diagrama de Pareto para concentración bacteriana. Este diagrama hace una comparación cuantitativa y ordenada de unos factores según sea su contribución a un determinado efecto. El diagrama de Pareto clasifica estos factores en 2 categorías, los poco vitales que son elementos muy importantes en su contribución y los muchos triviales que son elementos poco importantes²⁵.

²⁵BAQUERO LARGO,Andrea Catherine; PINTOR PINZON,Carolina andTRIANA GUERRERO,Karen. Análisis de los procesos de calidad: un enfoque hacia el cliente "Falcon Freight". Facultad de administración, 2012.

Imagen 16. Diagrama de Pareto estandarizada para concentración bacteriana cepa clínica



Fuente: Statgraphics versión Centurión XVI.II

De acuerdo al diagrama ni el factor potencia ni el factor tiempo o la interacción de AB tienen un efecto significativo sobre la variable de respuesta. Esto no quiere decir que no se presentó disminución en la concentración final sino que la reducción en la concentración no es lo suficientemente significativa para este caso. Además, un factor importante por el cual para este caso no hay significancia es la procedencia de la cepa. Esta proviene de un asilamiento en hemocultivo de una paciente con infección urinaria. El resultado microbiológico hecho a la cepa arrojó un perfil fenotípico de resistencia alto, esto quiere decir que es resistente a determinados antibióticos y puede ser la razón por la que el método no fue significativo.

Tabla 31. Análisis ANOVA para la cepa de alimentos.

<i>Fuente</i>	<i>Valor-P</i>
<i>A: Potencia</i>	0,0582
<i>B: Tiempo</i>	0,0056
<i>AB</i>	0,1586
<i>bloques</i>	0,0019
<i>Error total</i>	
<i>Total (corr.)</i>	

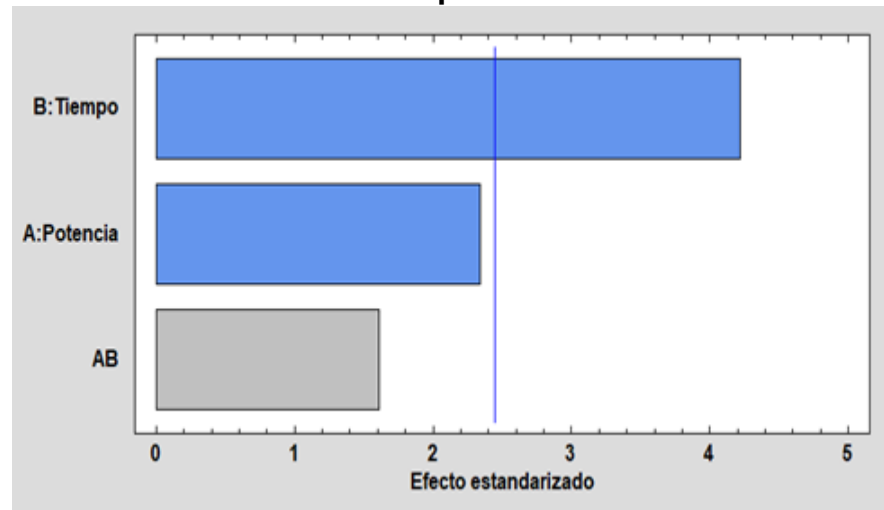
Fuente: Statgraphics versión Centurión XVI.II

Por su parte para la cepa de alimentos los 2 efectos tienen una valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%. Como lo muestra el ANOVA de los dos factores analizados el que tiene mayor efecto o mayor nivel de significancia sobre la variable de respuesta

es el factor tiempo. Esto se vio reflejado en el análisis que se hizo anteriormente con las réplicas de los dos tipos de cepa, en donde la tendencia era disminuir la concentración final de bacteria al aumentar el tiempo de exposición a cada una de las muestras.

La imagen 17 esquematiza un diagrama de Pareto para concentración bacteriana. Este diagrama hace una comparación cuantitativa y ordenada de unos factores según sea su contribución a un determinado efecto. El diagrama de Pareto clasifica estos factores en 2 categorías, los poco vitales que son elementos muy importantes en su contribución y los muchos triviales que son elementos poco importantes. De acuerdo al diagrama el factor más importante para este este experimento es el tiempo de exposición (B), seguido de la potencia (A) que tiene poca importancia con respecto al tiempo (alrededor del 50% menos) y por último la interacción AB.

Imagen 17. Diagrama de Pareto estandarizada para concentración bacteriana cepa alimento



Fuente: Statgraphics versión Centurión XVI.II

Después de realizado el análisis de los resultados se observa que el método de láser infrarrojo tiene efecto sobre la concentración bacteriana, siendo el tiempo la variable de mayor significancia. Las gráficas hechas en este capítulo muestran la tendencia que se presentan en todas las réplicas de disminución de la concentración al aumentar los tiempos de exposición, por lo que se concluye que a mayor tiempo de incidencia del láser infrarrojo la concentración final es menor.

4. COSTOS

La realización del proyecto presenta una estructura de costos significativos toda vez que es necesario utilizar recurso humano especializado y durante un número de horas considerable debido a las diferentes réplicas que se prevén realizar. Para este proyecto se deben usar equipos como el de luz láser que son de un muy alto precio (mayor a 10.000 euros) por lo que se requiere pagar su alquiler por horas, lo mismo que los laboratorios y sus equipos. Caso similar sucede con los reactivos requeridos para cultivar las cepas que generalmente son de un alto precio y que además deben ser adquiridas en su presentación comercial única.

La descripción detallada de los costos se puede verificar en la tabla 32.

Tabla 32. Costos detallados del experimento.

Rubro	Unidad de medida	Cantidad	Precio unitario	Monto total	
Talento humado [Mano de obra]					
Investigador principal	Horas	140	25.000	3.500.000	
Asistente de investigación	Horas	80	20.000	1.600.000	
Apoyo estadístico	Horas	60	25.000	1.500.000	
Asesor	Horas	40	25.000	1.000.000	
	Subtotal				7.600.000
Equipos					
Láser infrarrojo Wiser	Horas	8	120.000	960.000	
Autoclave	Horas	8	15.000	120.000	
Horno de secado	Horas	8	15.000	120.000	
Incubadora	Horas	8	15.000	120.000	
Agitador vórtex	Horas	8	15.000	120.000	
Balanza analítica	Horas	8	15.000	120.000	
	Subtotal				1.560.000
Materiales					
Tubos de ensayo	Unidad	40	3.500	140.000	
Cajas de petri	Cja x 25	1	75.000	75.000	
Micropipetas	Unidad	2	25.000	50.000	
Puntas de Micropipetas	Unidad	10	3.500	35.000	
Pipetas	Unidad	6	25.000	150.000	

Tabla 32. (Continuación)

Rubro	Unidad de medida	Cantidad	Precio unitario	Monto total	
Pipeteadores	Unidad	4	12.000	48.000	
Erlenmeyer	Unidad	6	34.000	204.000	
Microplaca	Cja x 25	1	230.000	230.000	
Algodón	Paquete	4	8.500	34.000	
Guantes de látex	Paquete	1	26.000	26.000	
Gorros	Cja x 25	1	34.000	34.000	
Tapabocas	Cja x 25	1	18.000	18.000	
Papelería	Varias	1	250.000	250.000	
	Subtotal				1.294.000
Reactivos					
Agar Mueller Hinton	X 500 g	1	660.000		
Agar Eosina Azul de metileno	X 500 g	1	535.000		
Caldo Mueller Hinton	X 500 g	1	770.000		
Alcohol para mechero	X 1.000 ml	1	18.000		
	Subtotal				1.983.000
Cepas					
Cepa comercial	Unidad	1	75.000		
Cepa clínica	Unidad	1	82.000		
Cepa de alimento	Unidad	1	68.000		
	Subtotal				225.000
	TOTAL GENERAL				12.662.000

El costo total para el desarrollo de este método es de 12'662.000 pesos aproximadamente, teniendo en cuenta que solo se trataron 100 ml de agua contaminada aproximadamente. Es decir, de un total de 1m³ de agua solo se desinfectó el 0,01% de ese total debido a que el montaje planteado daba para manejar volúmenes de agua pequeños. Con el total general del proyecto se puede abarcar un 80% del total del metro cúbico de agua que se vaya a desinfectar, siempre y cuando se modifique el montaje para tratar las muestras y que permita desinfectar volúmenes de agua más grandes.

5. CONCLUSIONES

Planteado el presente trabajo de investigación, realizadas las pruebas de laboratorio correspondiente y analizado los resultados se puede concluir que:

- La luz láser infrarroja tiene efecto desinfectante en muestras de agua contaminadas con *Escherichia coli* cuando se utilizan potencias de 7 y 10 watts y tiempos de exposición de 180 y 270 segundos usando un equipo láser infrarrojo con longitud de onda de 980 nm y potencias variables que van desde 0 hasta los 16 watts.
- Con el fin de evaluar el comportamiento de las bacterias de *E. coli* al someterlas al método de desinfección por láser infrarrojo se trabajó con dos cepas diferentes, una cepa clínica y una cepa de alimentos. Tanto la cepa clínica como la de alimentos presenta una disminución significativa en la concentración bacteriana final a los tiempos de 270 segundos, lo cual se evidencia en las gráficas de concentración inicial y final a potencias de 7 y 10 watts. De acuerdo a la gráfica del promedio de las tres réplicas, para la cepa clínica la concentración final a 7 watts y 270 segundos fue de 218.933.333 células/mL, mientras que a 10 watts y 270 segundos la concentración final fue de 188.977.778 células/mL. Estos valores comparados con la concentración final de la muestra que no tuvo incidencia de láser que fue de 255.145.211 célula/mL.
- De acuerdo al análisis de varianza realizado se pudo determinar que la variable que tiene mayor influencia sobre la variable de respuesta es el tiempo de exposición de acuerdo al valor-P que arroja el ANOVA con un nivel de confianza del 95%. El tiempo en el que el crecimiento bacteriano disminuye considerablemente es en el de 270 segundos.
- Luego de realizadas las pruebas de laboratorio se evidenció que el tiempo de exposición tiene un efecto significativo sobre la concentración bacteriana. Esto de acuerdo al análisis que se hizo con las concentraciones iniciales (101'000.000 Células/mL) y finales para cada una de las réplicas a los tiempos de 180 y 270 segundos y potencias de 7 y 10 watts. Además se realizó un análisis estadístico ANOVA mediante el software Statgraphics versión Centurión XVI.II en el cual se obtiene valores de P menores a 0,05, lo que quiere decir que el nivel de confianza es del 95% y que a valores de P menores a 0,05 el factor tendrá significancia sobre la variable de respuesta.
- Los costos para el desarrollo del sistema de desinfección de agua por el método de láser infrarrojo fueron de 12.662.000 COP. Este valor incluye los reactivos, materiales y cepas que se adquirieron para el desarrollo experimental. Con este valor obtenido para el desarrollo del método se pueden realizar más procesos de desinfección abarcando volúmenes de agua mayores a los del proyecto.

6. RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar pruebas adicionales con un equipo que permita trabajar con potencias más grandes a las trabajadas en este proyecto, partiendo de 15 o 20 watts en adelante debido a que se evidencio que a potencias de 7 y 10 watts hay efecto sobre la concentración bacteriana, lo que sugiere que a potencias más altas la disminución en la concentración de las muestras aumenta. Así mismo aumentar los tiempos de exposición para evaluar otros rangos de tiempo y corroborar si es solo el tiempo el que tiene efecto significativo sobre la concentración.
- Para la cuantificación bacteriana se recomienda utilizar un método validado, como el método de filtración por membrana o el de número más probable (NMP). Esto con el fin de que las mediciones de concentración bacteriana sean más precisas.
- Si se quiere desinfectar volúmenes de agua más grandes se recomienda modificar el montaje y plantear un tratamiento que abarque volúmenes de aguas grandes. Para este caso se desinfecto un volumen de 100 ml aproximadamente, por lo que los nuevos volúmenes tienen que ser superiores a 100 ml.
- Se recomienda evaluar el método de láser infrarrojo contra uno de los métodos convencionales para desinfección de agua con el fin de determinar la eficiencia del método.
- Con el fin de aprovechar totalmente la incidencia del láser infrarrojo para la desinfección de agua se recomienda cambiar la forma en que se hace incidir el láser sobre las muestras de agua, debido que para este caso por limitaciones del equipo la incidencia se hizo por la parte posterior.
- Se recomienda hacer un comparativo de costos con respecto a alguno de los método de desinfección de agua (sean físicos o químicos) para determinar si el método por láser infrarrojo es mejor en cuanto a costos que los otros métodos convencionales de desinfección.

BIBLIOGRAFÍA

BAQUERO LARGO, ANDREA CATHERINE; PINTOR PINZON, CAROLINA and TRIANA GUERRERO, KAREN. Análisis de los procesos de calidad: un enfoque hacia el cliente "Falcon Freight". Facultad de administración, 2012.

BRINEZ A. KJ, GUARNIZO G. JC, ARIAS V. SA. Calidad del agua para consumo humano en el departamento del Tolima. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*. 2012; 30(2):175.

CCAYAC-M-004 (2006) "Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable"

CHANNAH ROCK ANDBERENISE RIVERA. La Calidad del agua, *E. coli* y su salud. CHULLUNCUY-CAMACHO, NADIA CRISTINA and Universidad Nacional Mayor de San Marcos (Perú). Tratamiento de agua para consumo humano. En: INGENIERÍA INDUSTRIAL. Mar 11.

DONNA S. FRANCY, DONNA N. MYERS, KEVIN D. METZKER. *Escherichia coli* and fecal-coliform bacteria as indicators of recreational water quality.

EDE SM. *Infrared and photocatalytic studies of model bacterial species for water treatment*. Queensland University of Technology; 2006.

ESTUPIÑAN SANDRA, AVILA SARA. Control bacteriológico del agua de la red de distribución acueducto de las veredas Nápoles, Ponchos y Sebastopol en San Antonio de Tequendama, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, 2010.

ESTUPIÑAN TORRES SM, ÁVILA DE NAVIA, SARA LILIA, CELEITA DUENAS DP, MARTÍNEZ ESCOBAR E. Control bacteriológico del agua de la red de distribución "acueducto de las veredas Nápoles, ponchos y sebastopol" en San Antonio de Tequendama. *NOVA*. 2010; 8(14):220.

FRANCY DONNA, MYERS DONNA. *Escherichia Coli* and fecal-coliform bacteria as indicators of recreational water quality. U.S. Geological Survey 2015.

GARCÍA LUIS, SÁNCHEZ JOSÉ. Potabilización y depuración por láser Infrarrojo, Oficina de Patentes y marcas, España 2001.

GOEZ LOPEZ, *et al.* Determinación y diferenciación de *Escherichia coli* y coliformes totales usando un mismo sustrato cromogénico.

INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TECNICAS Y CERIFICACIÓN. Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación. NTC 1486. Sexta autorización. Bogotá: El Instituto, 2008.

_____. Referencias bibliográficas, contenido, forma y estructura. NTC 5613. Bogotá: El Instituto, 2008.

_____. Referencias documentales para fuentes de información electrónicas. NTC4490. Bogotá: El Instituto, 1998.

OSORIO ROBLES F, TORRES ROJO JC, SÁNCHEZ BAS M. Tratamiento de aguas para la eliminación de microorganismos y agentes contaminantes: Aplicación de procesos industriales a la reutilización de aguas residuales. Madrid, ES: Ediciones Díaz de Santos; 2010.

ROCK CHANNAH, RIVERA BERENISE. La calidad del agua, E.Coli y su salud. College of Agriculture and Life Sciences, University of Arizona 2014.

RODRÍGUEZ-ANGELES, GUADALUPE. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. En: SALUD PÚBLICA DE MÉXICO. Sep.vol. 44, no. 5

ANEXOS

ANEXO A

FICHAS DE INSTRUCCIONES DE USO PARA LOS REACTIVOS

Ficha de instrucciones para agar EMB.



INSTRUCCIONES DE USO –
MEDIO EN PLACAS LISTO
PARA SU USO



PA-254014.06

Rev.: April 2013

BD EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified

USO PREVISTO

BD EMB Agar, Modified (fórmula de Holt-Harris y Teague) es un medio ligeramente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de bacilos gram negativos entéricos (*Enterobacteriaceae* y diversos otros bacilos gram negativos) a partir de muestras clínicas.

PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico

EMB Agar se basa en una fórmula originalmente descrita por Holt-Harris y Teague en 1916¹. La fórmula original de Holt-Harris y Teague posteriormente fue modificada por Levine². La principal diferencia entre las dos es la inclusión de sacarosa en el medio de Holt-Harris y Teague. Ciertos microorganismos entéricos fermentan con mayor facilidad la sacarosa que la lactosa³.

BD EMB Agar, Modified contiene colorantes de azul de metileno y eosina Y, que inhiben las bacterias gram-positivas en cierto grado. Los colorantes también actúan como indicadores diferenciales en respuesta a la fermentación de la lactosa o la sacarosa por parte de los microorganismos. Los coliformes producen colonias de color negro azulado, mientras que las colonias de *Salmonella* y *Shigella* son incoloras o de color ámbar transparente. Las colonias de *Escherichia coli* pueden exhibir un brillo verde metálico característico debido a la rápida fermentación de la lactosa.

El conjunto de medios de aislamiento de baja selectividad para *Salmonella* en muestras fecales y de otros tipos incluye el EMB Agar (con y sin sacarosa)⁴.

Este medio puede inhibir el crecimiento de las bacterias gram-positivas como los estreptococos fecales, estafilococos y levaduras, o bien favorecer su crecimiento con formación de colonias puntiformes.

REACTIVOS

BD EMB Agar, Modified

Fórmula* por litro de agua destilada

Digerido pancreático de gelatina	10,0 g
Lactosa	5,0
Sacarosa	5,0
Fosfato dipotásico	2,0
Agar	13,5
Eosina Y	0,4
Azul de metileno	0,065

pH 7,2 +/- 0,2

*Ajustada o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES

IVD . Para uso exclusivo por parte de profesionales.

No usar placas que presenten señales de contaminación microbiana, decoloración, desecación, roturas u otras señales de deterioro.

Consultar en las INSTRUCCIONES GENERALES DE USO los procedimientos de manipulación aséptica, peligros biológicos y eliminación del producto después de su uso.

ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y el calentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los periodos de incubación recomendados.

PA-254014.06

- 1 -

Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Inocular muestras representativas con las siguientes cepas (consultar las **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO** para obtener instrucciones detalladas). Incubar las placas en condiciones aerobias a una temperatura de 35 ± 2 °C durante un periodo de 18 a 24 horas.

Cepas	Resultados del crecimiento
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color negro azulado con brillo verde metálico
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC 14028	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de gris claro a ámbar
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Crecimiento de adecuado a excelente; colonias desde incoloras hasta ámbar claro
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibición parcial; colonias incoloras
Sin inocular	Púrpura con un tinte verdoso anaranjado, ligeramente opalescente

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

BD EMB Agar, Modified (placas Stacker de 90 mm). Controladas microbiológicamente.

Materiales no suministrados

Medios de cultivo auxiliares, reactivos y equipo de laboratorio que se requiera.

Tipos de muestras

Este producto es un medio selectivo para bacilos gram negativos que puede utilizarse para el aislamiento de bacilos entericos gram negativos a partir de todo tipo de muestras clínicas (véase también **CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**).

Procedimiento de análisis

Una vez recibida la muestra en el laboratorio, extenderla tan pronto como sea posible. La placa de extendido se emplea sobre todo para aislar cultivos puros en muestras que contengan flora microbiana mixta. Si por el contrario el material se cultiva directamente empleando una torunda, hacerla girar en una sección pequeña cercana al borde, extendiendo luego a partir de esta área inoculada. Asimismo es preciso extender un medio no selectivo, p. ej. agar Columbia, con sangre de carnero al 5% para suministrar una indicación de otros microorganismos presentes en la muestra. Incubar las placas, protegidas de la luz, a una temperatura de 35 ± 2 °C durante un periodo de 18 a 24 h.

Resultados

En la tabla siguiente se indica la morfología característica de las colonias:

Microorganismos	BD EMB Agar, Modified
<i>E. coli</i>	Colonias grandes, color negro azulado, brillo verde metálico
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Colonias grandes, mucoides, color negro azulado
<i>Proteus</i>	Colonias grandes, incoloras
<i>Salmonella</i>	Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar
<i>Shigella</i>	Colonias grandes, desde incoloras hasta color ámbar
<i>Pseudomonas</i>	Colonias irregulares, incoloras
Bacterias gram-positivas	Crecimiento escaso o nulo

Características de rendimiento y limitaciones del procedimiento

En BD EMB Agar, Modified, crecerán microorganismos de la familia *Enterobacteriaceae* y una diversidad de bacilos gram-negativos, p. ej. *Pseudomonas* y *Aeromonas*³⁴. Frecuentemente este medio no inhibe completamente los microorganismos gram-positivos.

Ciertas pruebas de diagnóstico pueden efectuarse directamente en este medio; no obstante, para lograr la identificación total se necesitan pruebas bioquímicas, y (si así se indica) pruebas inmunológicas usando cultivos puros. Consultar las referencias correspondientes³⁻⁵.

REFERENCIAS

1. Holt-Harris, J.E., and O. Teague. 1916. A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosus* from stools. J. Infect. Dis. 18:596-600.
2. Levine, M. 1918. Differentiation of *B. coli* and *B. aerogenes* on a simplified eosin-methylene blue agar. J. Infect. Dis. 23:43-47.
3. MacFaddin, J.F. 1985. Media for the Isolation – cultivation – maintenance of medical bacteria. Volume 1. Williams and Wilkins, Baltimore, London.
4. Farmer III, J.J. 2003. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenen (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Bopp, C.A., Brenner, F.W., Fields, P.I., Wells, J.G., and N.A. Strockbine. 2003. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenen (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

ENVASE Y DISPONIBILIDAD

BD EMB Agar, Modified

Nº de cat. 254014	Medio en placas listo para su uso, 20 placas
Nº de cat. 254073	Medio en placas listo para su uso, 120 placas

INFORMACION ADICIONAL

Para obtener más información, diríjase a su representante local de BD.



Becton Dickinson GmbH

Tullastraße 8 – 12

D-69126 Heidelberg/Germany

Phone: +49-62 21-30 50 Fax: +49-62 21-30 52 16

Reception_Germany@europe.bd.com

<http://www.bd.com>

<http://www.bd.com/europe/regulatory/>

ATCC is a trademark of the American Type Culture Collection

BD, BD Logo and all other trademarks are the property of Becton, Dickinson and Company. © 2013 BD

Ficha de instrucciones para agar MacConkey Becton Dickinson.



INSTRUCCIONES DE USO –
MEDIOS EN PLACA LISTOS
PARA USAR



PA-254025.07

Rev.: July 2014

BD MacConkey II Agar

USO PREVISTO

BD MacConkey II Agar es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de *Enterobacteriaceae* y diversos otros bacilos gram negativos a partir de muestras clínicas.

PRINCIPIOS Y EXPLICACION DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico.

En la actualidad, existen numerosos medios de cultivo para aislamiento, cultivo e identificación de *Enterobacteriaceae* y determinados organismos no fermentadores. Uno de los primeros fue desarrollado por MacConkey y publicado en 1900 y 1905^{1,2}. Esta fórmula fue diseñada sabiendo que las sales biliares precipitan por acción de ácidos y determinados microorganismos entéricos fermentan la lactosa, mientras que otros no presentan dicha capacidad. Posteriormente, este medio fue modificado varias veces^{3,4}.

El agar MacConkey es sólo ligeramente selectivo, dado que la concentración de sales biliares, que inhiben los microorganismos gram positivos, es baja en comparación con otros medios en placa entéricos. Se recomienda el uso de este medio en muestras clínicas con posible flora microbiana mixta, tal como procedentes de la orina, del sistema respiratorio, de heridas y otras, porque permite la agrupación preliminar de bacterias entéricas y otras bacterias gram negativas en organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa^{5,6}. El agar MacConkey también se utiliza en el examen microbiológico de alimentos⁷.

La fórmula del agar MacConkey II se diseñó para mejorar la inhibición del agrupamiento dinámico de la especie *Proteus*, lograr una diferenciación más definitiva de los organismos fermentadores y no fermentadores de lactosa y alcanzar un crecimiento superior de las bacterias entéricas.

En BD MacConkey II Agar, las peptonas proporcionan los nutrientes. Cristal violeta inhibe las bacterias gram positivas, en especial los enterococos y estafilococos. La diferenciación de los microorganismos entéricos se logra mediante la combinación de lactosa y el indicador de pH rojo neutro. Se producen colonias incoloras o de color de rosa a rojo según la capacidad del aislado para fermentar carbohidratos.

REACTIVOS

BD MacConkey II Agar

Fórmula* por litro de agua purificada

Digerido pancreático de gelatina	17,0 g
Digerido pancreático de caseína	1,5
Digerido péptico de tejido animal	1,5
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
Cloruro sódico	5,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5

pH 7,1 ± 0,2

* Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES

. Solamente para uso profesional.

No utilizar las placas si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, agrietamiento o cualquier otro signo de deterioro.

PA-254025.07

- 1 -

Consultar los procedimientos de manipulación aseptica, riesgos biológicos y eliminación del producto usado en el documento INSTRUCCIONES GENERALES DE USO.

ALMACENAMIENTO Y VIDA UTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura entre 2 y 8 °C, envueltas en su envase original, hasta justo antes de usarlas. Evitar la congelación y el calentamiento excesivo. Las placas pueden inocularse hasta su fecha de caducidad (ver la etiqueta en el paquete) e incubarse durante los periodos de incubación recomendados. Las placas de grupos de 10 placas ya abiertos pueden usarse durante una semana siempre que se almacenen en un lugar limpio a una temperatura entre 2 y 8 °C.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Inocular muestras representativas con las cepas siguientes (para obtener los detalles, véase el documento INSTRUCCIONES GENERALES DE USO). Incubar las placas a 35 ± 2 °C en una atmósfera aerobia. Examinar las placas después de 18 – 24 h para comprobar la extensión del crecimiento, el tamaño de las colonias, la pigmentación y la selectividad.

Cepas	Resultados del crecimiento
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crecimiento; colonias de color rosa
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Crecimiento; colonias de incoloras a color beige, agrupamiento dinámico inhibido
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC 14028	Crecimiento; colonias de incoloras a color beige
<i>Salmonella</i> Abony DSM 4224	Crecimiento; colonias de incoloras a color beige
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Crecimiento; colonias incoloras
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibición de parcial a completa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibición de parcial a completa
Sin inocular	Rosa claro, ligeramente opalescente

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

BD MacConkey II Agar (placas Stacker de 90 mm). Controladas microbiológicamente.

Materiales no suministrados

Medios de cultivo auxiliar, reactivos y el equipo de laboratorio que se requiera.

Tipos de muestras

Se trata de un medio selectivo para el aislamiento de *Enterobacteriaceae* y diversos bacilos gram negativos y puede utilizarse para todos los tipos de muestras clínicas y para una diversidad de materiales no clínicos (véase también CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO).

Procedimiento de análisis

Una vez recibida la muestra en el laboratorio, extenderla tan pronto como sea posible. La placa para extender las muestras se utiliza principalmente para aislar cultivos puros de las muestras con flora mixta.

Otra opción es, si el material se cultiva directamente de una torunda, hacerla rodar sobre una pequeña sección del borde, extendiendo luego a partir de esta área inoculada. Asimismo, es preciso inocular un medio no selectivo tal como el agar Columbia con sangre de camero al 5% para proporcionar una indicación de otros organismos presentes en la muestra.

Incubar las placas, protegidas de la luz, a 35 ± 2 °C (no utilizar atmósfera enriquecida con CO₂ con agar MacConkey II) durante 18 - 24 h o más si es necesario.

Resultados

La morfología de colonia característica en BD MacConkey II Agar es la siguiente:

Organismos	Resultados del crecimiento
<i>E. coli</i>	Colonias de color de rosa a rojo (pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis)
<i>Enterobacter, Klebsiella</i>	Colonias mucoides de color rosa
<i>Proteus</i>	Colonias incoloras, inhibición de agrupamiento dinámico alrededor de colonias aisladas*
<i>Salmonella, Shigella</i>	Colonias incoloras. Color del medio: Anaranjado a ámbar
<i>Pseudomonas</i>	Colonias irregulares, de incoloras a color rosa

Inhibición entre parcial y completa de bacterias gram positivas.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

BD MacConkey II Agar es uno de los medios estándar utilizados para el tratamiento primario en placas de las muestras clínicas y para diversos materiales no clínicos. En este medio crecerán todos los organismos de la familia *Enterobacteriaceae* y varios bacilos gram negativos, por ejemplo, *Pseudomonas* y otros géneros relacionados^{5,9}. Los organismos no fermentadores y otros bacilos gram negativos sensibles a los componentes selectivos no crecen en este medio. Consultar los capítulos correspondientes en las referencias antes de utilizar el medio para organismos específicos^{5,9}.

Se ha descrito la inhibición de algunas *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonas aeruginosa* en agar MacConkey cuando se incuban en una atmósfera enriquecida con CO₂¹⁰.

Ciertas pruebas de diagnóstico pueden efectuarse directamente en este medio; no obstante, para lograr la identificación completa se necesitan pruebas bioquímicas, y (si así se indica) pruebas inmunológicas usando cultivos puros. Consultar las referencias correspondientes^{5-7,9}.

REFERENCIAS

1. MacConkey, A.T. 1900. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli communis* and the *Bacillus typhi abdominalis*. The Lancet, Part II:20.
2. MacConkey, A. 1905. Lactose-fermenting bacteria in faeces. J. Hyg. 5:333-379.
3. Levine, M., and H.W. Schoenlein. 1930. A compilation of culture media for the cultivation of microorganisms. The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
4. MacFaddin, J.F. 1985. Media for isolation-cultivation-identification-maintenance of medical bacteria, vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore.
5. Baron, E.J., L.R. Peterson, and S.M. Finegold. 1994. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 9th ed. Mosby-Year Book, Inc., St. Louis.
6. Farmer III, J.J. 2003. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenen (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Downes, F.P., and K. Ito. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th edition. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.
8. Thomson, R.B., and J.M. Miller. 2003. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenen (ed.). Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
9. Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Pfaller, and R. H. Tenen (ed.). 2003. Manual of clinical microbiology, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Mazura-Reetz, G., T.R. Neblett, and J.M. Galperin. 1979. MacConkey agar: CO₂ vs. ambient incubation, abstr. C 179, p. 339. Abstr. 79th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1979.

ENVASE/DISPONIBILIDAD

BD MacConkey II Agar

Nº de cat. 254025

Medios en placa listos para usar, 20 placas

Nº de cat. 254078

Medios en placa listos para usar, 120 placas

Ficha de instrucciones para agar Mueller Hinton de Becton Dickinson



INSTRUCCIONES DE USO –
MEDIOS EN PLACA LISTOS
PARA USAR



PA-254032.08

Rev.: Febrero 2017

BD Mueller Hinton II Agar BD Mueller Hinton II Agar 150 mm BD Mueller Hinton II Agar, Square

USO PREVISTO

BD Mueller Hinton II Agar, disponible en varios formatos de placa, se utiliza en el procedimiento de difusión en disco estandarizado para la determinación de la sensibilidad de cepas aisladas a partir de muestras clínicas de organismos aerobios de rápido crecimiento ante agentes antimicrobianos, conforme a las normas de Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST; Comité Europeo de Antibiógramas)^{1,2}.

PRINCIPIOS Y EXPLICACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

Método microbiológico

Dado que los laboratorios de microbiología clínica utilizaban a principios de la década de 1960 una amplia variedad de procedimientos para determinar la sensibilidad de bacterias a antibióticos y otros agentes quimioterapéuticos, Bauer, Kirby y otros desarrollaron un procedimiento estandarizado en el que se seleccionó como medio de prueba el agar Mueller Hinton, un medio originalmente diseñado para el aislamiento de gonococos¹⁻⁵. Un estudio colectivo internacional posterior confirmó el valor del agar Mueller Hinton para este propósito por la reproducibilidad relativamente buena del medio, la sencillez de su fórmula y la riqueza de los datos experimentales que habían sido acumulados utilizando este medio⁶.

CLSI y EUCAST han publicado normas de rendimiento para el procedimiento Bauer-Kirby, documentos que deben consultarse para obtener detalles^{7,8}. Se han desarrollado otras normas nacionales para las pruebas de sensibilidad antimicrobianas según el procedimiento Bauer-Kirby. En dichas normas, las densidades de inóculo, el método de inoculación, los tamaños de las zonas resultantes y el modo de interpretación pueden ser diferentes de las recomendaciones de CLSI y EUCAST.

El procedimiento Bauer-Kirby se basa en la difusión en un gel de agar de sustancias antimicrobianas que se impregnan en discos de papel⁹. En comparación con los métodos anteriores, que utilizaban discos con concentraciones altas y bajas de agentes antimicrobianos, y que basaban su interpretación en la presencia o ausencia de zonas de inhibición, este método utiliza discos con una sola concentración de agente antimicrobiano y los diámetros de zona presentan una correlación con las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI)^{1-3,7-9}.

En el procedimiento de prueba, se extiende una suspensión estandarizada del organismo mediante torundas sobre toda la superficie del medio. Los discos de papel impregnados con cantidades específicas de antibióticos y otros agentes antimicrobianos luego se colocan en la superficie del medio, se incuba la placa y se miden las zonas de inhibición en torno a cada disco. La determinación de si el organismo es sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) a un agente se realiza mediante la comparación de las zonas obtenidas con los que aparecen en las tablas 2A a 2D del documento M100 (M2) de CLSI¹⁰. La determinación de si el organismo es sensible (S) o resistente (R) a un agente se realiza mediante la comparación del tamaño de las zonas obtenidas con los tamaños enumerados en las tablas de valores críticos de EUCAST¹¹.

Se han identificado diversos factores que afectan a los análisis de sensibilidad mediante el método de difusión en disco. Se incluyen en esta categoría el medio, la humedad excesiva de la superficie del medio, la profundidad del agar, la potencia del disco, la concentración de inóculo, el pH y la producción de β -lactamasa por parte de los organismos de prueba^{6-9,12}. **BD Mueller Hinton II Agar** se fabrica para que contenga bajos niveles de timina y timidina y niveles controlados de calcio y magnesio¹⁵⁻¹⁷. Los niveles de timina y timidina de materias primas se determinan utilizando el procedimiento de difusión en disco con discos de trimetoprima-sulfametoxazol (SXT) y *Enterococcus faecalis* ATCCTM 29212. Los niveles de calcio y magnesio se controlan analizando las materias primas y suplementando con fuentes de calcio y/o magnesio según se requiera para producir los diámetros de zona correctos con antibióticos de aminoglucósidos y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Se ajustó la profundidad del agar de cada formato de placa de **BD Mueller Hinton II Agar** para cumplir las recomendaciones de CLSI y EUCAST^{7,8}.

REACTIVOS

BD Mueller Hinton II Agar

Fórmula* por litro de agua purificada

Extracto de carne bovina	2,0 g
Hidrolizado ácido de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar	17,0

pH 7,3 +/- 0,2

*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

PRECAUCIONES

IVD . Solamente para uso profesional. ②

No utilizar las placas si muestran signos de contaminación microbiana, decoloración, deshidratación, grietas o cualquier otro signo de deterioro. La reducción excesiva de este medio debido a la deshidratación puede causar resultados de sensibilidad falsos.

Consultar los procedimientos de manipulación aséptica y eliminación del producto usado, así como los riesgos biológicos, en el documento **INSTRUCCIONES GENERALES DE USO**.

ALMACENAMIENTO Y VIDA ÚTIL

Al recibir las placas, almacenarlas en un lugar oscuro a una temperatura de 2 a 8 °C, en su envase original hasta justo antes de su uso. Evitar la congelación y el sobrecalentamiento.

Las placas pueden inocularse hasta la fecha de caducidad (véase la etiqueta del paquete) e incubarse durante los periodos de incubación recomendados.

Las placas de pilas abiertas de 10 unidades almacenadas en un área limpia a una temperatura de 2 a 8 °C pueden utilizarse durante una semana.

CONTROL DE CALIDAD DEL USUARIO

Para el control de calidad del usuario, se deben consultar las normas de CLSI¹⁰ y EUCAST¹⁸ apropiadas o, si procede, las normas nacionales aplicables. Inocular muestras representativas con las cepas siguientes en cada medio (para obtener más datos, véase **Tipos de muestras y Procedimiento de análisis**). Incubar las placas, preferiblemente en posición invertida, según las condiciones de temperatura, tiempo y atmosféricas indicadas a continuación. Las placas de **BD Mueller Hinton II Agar** y los discos antimicrobianos utilizados deben analizarse al menos dos veces por semana para determinar el rendimiento adecuado.

Tabla 1: Resultados previstos para los intervalos de diámetro de la zona de inhibición de las cepas de control de calidad según CLSI¹⁹ y EUCAST²⁰

Cepa	Agente antimicrobiano	Intervalo (mm)	Incubación
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ¹	Ampicilina (10 µg)	15-22	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Imipenem (10 µg)	26-32	
	Gentamicina (10 µg)	19-26	
	Amicacina (30 µg)	19-26	
	Ciprofloxacino (5 µg)	30-40	
	Trimetoprima-sulfametoxazol SXT (1,25 µg – 23,75 µg)	23-29	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 ¹	Amoxicilina/ácido clavulánico (30 µg)	17-22	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Ampicilina/ Sulbactam (30 µg)	13-19	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 ²	Trimetoprima-sulfametoxazol (1,25 µg-23,75 µg)	26-34	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Ciprofloxacino (5 µg)	19-25	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 ³	Tetraciclina (30 µg)	24-30	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Gentamicina (10 µg)	19-27	
	Eritromicina (15 µg)	22-30	
	Clindamicina (2 µg)	24-30	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 ²	Tetraciclina (30 µg)	23-31	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Gentamicina (10 µg)	19-25	
	Eritromicina (15 µg)	23-29	
	Clindamicina (2 µg)	23-29	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ¹	Aztreonam (30 µg)	23-29	CLSI: 16 – 18 h, 35±2 °C EUCAST: 16 – 20 h, 35±1 °C
	Amicacina (30 µg)	18-26	
	Gentamicina (10 µg)	17-23	
	Imipenem (10 µg)	20-28	
Sin inocular	De incoloro a ámbar claro		

¹: Resultados de las cepas de control de calidad según CLSI y EUCAST

²: Resultados de las cepas de control de calidad según EUCAST

³: Resultados de las cepas de control de calidad según CLSI

PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados

BD Mueller Hinton II Agar (proporcionado en varios formatos de placa diferentes; consultar Envase/Disponibilidad). Con control microbiológico.

Materiales no suministrados

- Según CLSI: caldo de inóculo en tubo, tal como BD Trypticase™ Soy Broth (caldo de digerido de soja-caseína) o caldo Mueller Hinton II (con ajuste de cationes), para la preparación de un inóculo estándar y caldo estéril o solución salina para la dilución del inóculo⁷.
Según EUCAST: solución salina al 0,9% (en volúmenes de 5 mL) para la preparación de un inóculo estándar⁸.
- Patrón de comparación de sulfato de bario (0,5 mL de 0,048 M BaCl₂ [1,175% p/v BaCl₂ 2H₂O] a 99,5 mL de 0,18 M [0,36 N] H₂SO₄ [1% v/v]) o
- Un dispositivo fotométrico para ajustar la turbidez de la suspensión de inóculo para que sea equivalente al patrón 0,5 de McFarland.

4. Como alternativa a los materiales anteriores (1 – 3), se puede utilizar el sistema **BD Prompt™ Inoculation System** (dispositivo volumétrico de preparación de inóculos)^{7,8,25}.
5. Cultivos de control según CLSI: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603¹⁰.
Cultivos de control según EUCAST: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 y ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y ATCC 51299, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Staphylococcus aureus* NCTC 12493¹⁶.
6. Discos de papel impregnados con cantidades específicas de agentes antimicrobianos^{7,8}, tales como los discos de análisis de sensibilidad **BD Sensi-Disc™**.
7. Dispensador, tal como el dispensador de 6, 8 o 12 posiciones **BD Sensi-Disc**. También se encuentra disponible un dispensador adecuado para las placas cuadradas de agar Mueller Hinton II.
8. Regla u otro dispositivo para medir los tamaños de zona en milímetros.
9. Medios de cultivo auxiliar, reactivos y el equipo de laboratorio que se requiera.

Tipos de muestras

Este producto se utiliza para el análisis de sensibilidad de cultivos puros que se han aislado a partir de muestras clínicas (véase también **CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**). Se ha propuesto que el análisis de sensibilidad antimicrobiana directa puede ser realizado en hemocultivos y cultivos de orina; sin embargo, deben repetirse y confirmarse las pruebas con cultivos puros²¹⁻²⁴.

Procedimiento de análisis

Esta metodología describe el método de suspensión directa de colonias tal como recomiendan CLSI⁷ y EUCAST⁸:

1. Asegurarse de que se encuentre disponible un cultivo puro y reciente (del día anterior) de medio no selectivo tal como agar sangre.
Según CLSI: en el caso de los análisis de sensibilidad sistemáticos, el inóculo se puede preparar realizando una suspensión directa en solución salina o caldo de suspensión de colonias.
Según EUCAST: en el caso de los análisis de sensibilidad sistemáticos, el inóculo se puede preparar realizando una suspensión directa en solución salina de varias colonias morfológicamente similares.
2. Dicha suspensión debe ajustarse inmediatamente a los patrones de turbidez del sulfato de bario (patrón 0,5 de McFarland) sin incubación. La turbidez del patrón y del inóculo de prueba deben compararse sosteniendo ambos tubos contra un fondo blanco con líneas negras claramente marcadas, o se puede utilizar un dispositivo fotométrico.
3. Se han considerado aceptables para fines de análisis sistemáticos métodos alternativos de preparación del inóculo en los que se utilizan dispositivos que permiten la normalización directa de los inóculos sin un ajuste de la turbidez, como **BD Prompt Inoculation System**²⁵.
4. En la medida de lo posible, utilizar el inóculo en los 15 min posteriores. La suspensión debe utilizarse siempre en los 60 min siguientes a la preparación. Sumergir una torunda estéril en el inóculo diluido correctamente y girarla varias veces contra la porción superior de la pared interna del tubo para exprimir el exceso de líquido y evitar así una inoculación excesiva.
5. Inocular toda la superficie del agar de la placa tres veces, girando la placa 60 grados cada vez para obtener una inoculación uniforme.
6. Según CLSI: La tapa puede dejarse entreabierta entre 3 y 5 min y mantenerse la placa a temperatura ambiente durante no más de 15 min para permitir que se absorba la humedad de la superficie antes de aplicar los discos impregnados con agentes antimicrobianos. Aplicar los discos mediante un dispensador de discos antimicrobianos, empleando técnicas asépticas. Depositar los discos de modo que los centros queden a no menos de 24 mm de distancia.
Según EUCAST: aplicar los discos a la placa seca en los 15 min posteriores a la inoculación, empleando técnicas asépticas. Depositar un máximo de seis discos en la placa.

7. Una vez colocados los discos sobre el agar, presionarlos con una aguja o pinza estéril hasta que el contacto con la superficie del medio sea completa. Este paso no es necesario si los discos se colocan con los dispensadores de autoapisonamiento BD Sensi-Disc.
8. En los 15 min posteriores a la aplicación de los discos, invertir la posición de las placas e introducir las en la incubadora. Las placas no deben incubarse en una concentración aumentada de dióxido de carbono. Para conocer las condiciones recomendadas para la incubación, consultar CLSI y EUCAST^{7,8,10,11}.

Lectura de los resultados

1. Después de la incubación debe estar visible una superficie confluyente de crecimiento. Si solo crecen colonias aisladas, el inóculo está demasiado diluido y el análisis debe repetirse.
2. Según CLSI: medir el diámetro de las zonas de inhibición completa (observadas a simple vista), incluido el diámetro del disco, hasta el milímetro más cercano, mediante calibradores deslizantes, una regla o una plantilla preparada con tal fin. El dispositivo de medición se sostiene en la parte inferior de la placa invertida sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina desde arriba⁷.
Según EUCAST: medir el diámetro de las zonas de inhibición completa (observadas a simple vista), incluido el diámetro del disco, hasta el milímetro más cercano, mediante calibradores deslizantes o una regla. El dispositivo de medición se sostiene en la parte inferior de la placa invertida sobre un fondo negro iluminado con una luz reflejada. La placa se sujeta a unos 30 cm del ojo⁸.
3. El criterio de valoración debe tomarse como el área que no muestra crecimiento visible evidente que pueda detectarse a simple vista. Desestime el crecimiento leve de colonias diminutas que pueda detectarse con dificultad cerca del borde de la zona evidente de inhibición.
4. Según CLSI: el análisis de *Staphylococcus aureus* con discos de oxacilina supone una excepción, igual que el análisis de enterococos con vancomicina. En dichos casos, la luz transmitida debe utilizarse para detectar un leve crecimiento en torno al disco, lo que se demuestra por la presencia de cepas de SARM "resistentes ocultas" o enterococos resistentes a vancomicina^{7,26}. Con la especie *Proteus*, si la zona de inhibición es lo suficientemente evidente para medir, desestimar cualquier agrupación activa dentro de la zona. Con trimetoprima y las sulfonamidas, los antagonistas en el medio pueden hacer posible un leve crecimiento; por consiguiente, desestimar el crecimiento ligero (20% o menos de la superficie de crecimiento) y medir el margen más evidente para determinar el diámetro de zona.
Según EUCAST: en caso de zonas dobles, debe medirse la zona interior, a menos que se especifique de otro modo⁸.

Recuento e interpretación de los resultados.

Según CLSI:

los diámetros de zona medidos alrededor de los discos deben compararse con los que aparecen en las tablas 2A a 2D del documento M100 (M2) de CLSI¹⁰. Los resultados obtenidos con organismos específicos luego pueden describirse como resistentes, intermedios o sensibles.

Según EUCAST:

interpretar el diámetro de las zonas mediante la comparación de estos con las tablas de valores críticos¹¹. A continuación, el resultado obtenido con cada microorganismo específico puede notificarse como resistente o sensible. Para consultar información adicional sobre las características específicas del crecimiento, la interpretación de los resultados y otros documentos informativos, consulte EUCAST.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO Y LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Mueller Hinton Agar es un medio estándar utilizado para la prueba de sensibilidad de bacterias aerobias de rápido crecimiento o anaerobias facultativas, como estafilococos, enterococos, miembros de la especie *Enterobacteriaceae* y bacilos gram negativos aerobios (por ej., *Pseudomonas* spp). Los documentos informativos para la interpretación de los resultados de sensibilidad se actualizan anualmente y es preciso consultar la versión más reciente para garantizar la interpretación correcta de los resultados obtenidos^{10,11}. Se han desarrollado diferentes procedimientos y otros medios y condiciones para analizar las especies exigentes, es decir, *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp. y *Streptococcus pneumoniae*, y estreptococos.

El procedimiento normalizado de CLSI y EUCAST no se aplica al análisis de los organismos anaerobios obligados, los organismos que demuestran un crecimiento débil o lento en el agar Mueller Hinton o aquellos organismos que muestran una variación marcada de una cepa a otra con respecto a la velocidad de crecimiento^{7,8}. Los organismos exigentes (por ej., *Haemophilus influenzae*) deben analizarse según las recomendaciones de CLSI y EUCAST^{7,8}.

Evaluación de rendimiento interna

El rendimiento de BD Mueller Hinton II Agar (todos los formatos de placa) se validó internamente mediante las cepas de control de calidad recomendadas, incluidas cepas con mecanismos de resistencia caracterizados (*Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Enterococcus faecalis* ATCC 51299, *Staphylococcus aureus* NCTC 12493, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 con amoxicilina-ácido clavulánico AMC-3)^{19,20,34}.

En la Tabla 2 se resumen los agentes antimicrobianos validados para las cepas de control de calidad y las cepas con mecanismos de resistencia caracterizados. A menos que se indique de otro modo, los tamaños de las zonas de inhibición determinadas para los agentes antimicrobianos validados se encontraban dentro de los intervalos de diámetro para la zona de inhibición especificados por CLSI y EUCAST^{19,20}.

Otros estudios del rendimiento realizados con aislados clínicos de SARM que albergan el tipo de resistencia *mecC* indicaron que BD Mueller Hinton II Agar detecta con precisión las cepas de SARM positivas para *mecC*^{34,35}.

Ficha de instrucciones caldo Mueller Hinton de Becton Dickinson



BBL Mueller Hinton Broth
8806691 • Rev. 02 • Junio de 2012



PROCEDIMIENTOS DE CONTROL DE CALIDAD

I INTRODUCCION

Mueller Hinton Broth es un medio de uso general que puede utilizarse en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos exigentes y no exigentes.

II REALIZACION DEL PROCEDIMIENTO DE ANALISIS

- Inocular muestras representativas con los cultivos enumerados a continuación.
 - Inocular 1 µL (0,001 mL) procedente de un cultivo de 4 – 5 h de caldo de cultivo **Trypticase** Soy Broth diluido para obtener $10^6 - 10^7$ UFC/mL.
 - Incubar a 36 ± 1 °C en condiciones atmosféricas apropiadas.
- Examinar los tubos después de 18 – 24 h para detectar el crecimiento.

Resultados previstos

Organismos	ATCC	Recuperación
* <i>Escherichia coli</i>	25922	Crecimiento de moderado a denso
* <i>Enterococcus faecalis</i>	29212	Crecimiento de moderado a denso
* <i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Crecimiento de moderado a denso

*Cepa de organismo recomendada para control de calidad del usuario.

III CONTROL DE CALIDAD ADICIONAL

- Examinar los tubos como se describe en la sección "Deterioro del producto".
- Examinar visualmente los tubos representativos para asegurarse de que los defectos físicos existentes no interfieran con el uso.
- Determinar el pH potenciométricamente a temperatura ambiente para verificar el cumplimiento de la especificación de $7,3 \pm 0,2$.
- Incubar tubos representativos no inoculados a $33 - 37^\circ\text{C}$ y $20 - 25^\circ\text{C}$ durante 72 h y examinar para detectar contaminación microbiana.

INFORMACION DEL PRODUCTO

IV USO PREVISTO

Mueller Hinton Broth es un medio de uso general que puede utilizarse en el cultivo de una amplia variedad de microorganismos exigentes y no exigentes. En esta fórmula no se han ajustado las concentraciones de iones de calcio y magnesio para hacerla adecuada para su uso en procedimientos cuantitativos en pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

V RESUMEN Y EXPLICACIÓN

La fórmula de Mueller Hinton fue desarrollada originalmente como un medio de agar sencillo y transparente para el cultivo de la *Neisseria* patógena¹. Se desarrollaron otros medios que remplazaron el uso del agar Mueller Hinton para el cultivo de la *Neisseria* patógena, pero se utilizó ampliamente en la determinación de la resistencia a la sulfonamida por parte de los gonococos y otros organismos. Ahora se recomienda como medio de prueba para uso en pruebas de sensibilidad antimicrobiana²⁻³.

Mueller Hinton Broth, sin ajustar, presenta una fórmula similar a la del medio sólido, pero sin agar, para uso cuando se prefiera un medio líquido. Se puede utilizar para el cultivo general de bacterias.

VI PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

El hidrolizado ácido de caseína y el extracto de carne aportan aminoácidos y otras sustancias nitrogenadas, minerales, algunas vitaminas y otros nutrientes para favorecer el crecimiento de microorganismos. El almidón actúa como coloide de protección contra las sustancias tóxicas que puedan estar presentes en el medio. La hidrólisis del almidón durante el procesamiento en autoclave proporciona una pequeña cantidad de dextrosa, que constituye una fuente de energía.

VII REACTIVOS

Mueller Hinton Broth

Fórmula aproximada* por litro de agua purificada

Hidrolizado ácido de caseína	17,5 g
Extracto de carne bovina	3,0 g
Almidón	1,5 g

*Ajustada y/o complementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

Advertencias y precauciones: Para uso diagnóstico *in vitro*.

Los tubos y frascos con tapas ajustadas deben abrirse con cuidado para evitar lesiones por la rotura del vidrio.

Emplee una técnica aséptica y siga las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todos los procedimientos. Después de su utilización, los tubos preparados, los recipientes de muestras y otros materiales contaminados deben esterilizarse en autoclave antes de ser desechados.

Instrucciones de almacenamiento: En el momento de recibir los tubos y frascos, guardarlos en un lugar oscuro a una temperatura de 2 – 25 °C. Evitar la congelación y el sobrecalentamiento. No abrir hasta que se vayan a utilizar. Reducir al mínimo la exposición a la luz. Los medios en tubos y en frascos almacenados como se indica en sus etiquetas hasta momentos antes de su utilización pueden ser inoculados hasta la fecha de caducidad e incubados durante los períodos recomendados de incubación. Dejar que el medio se caliente a temperatura ambiente antes de la inoculación.

Deterioro del producto: No utilizar los tubos ni los frascos si muestran evidencia de contaminación microbiana, decoloración, precipitación o cualquier otro signo de deterioro.

VIII. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Este medio no es adecuado para uso directo con muestras u otros materiales con flora microbiana mixta, excepto como caldo de enriquecimiento de "reserva" además de los medios en placa primarios. Consultar las referencias correspondientes para mayor información⁴⁶.

IX. PROCEDIMIENTO

Materiales suministrados: Mueller Hinton Broth

Materiales necesarios pero no suministrados: Medios de cultivo auxiliar, reactivos, organismos para control de calidad y el equipo de laboratorio que se requiera.

Procedimiento de análisis: Emplee una técnica aséptica y siga las precauciones habituales contra riesgos microbiológicos durante todos los procedimientos.

Los organismos para subcultivar primero deben aislarse en cultivo puro en un medio sólido apropiado. Transferir crecimiento del medio de aislamiento al Mueller Hinton Broth con técnicas bacteriológicas estándar⁴⁷.

Para lograr el enriquecimiento, inocular la muestra en los medios primarios y luego en el caldo, según los procedimientos recomendados.

Incubar los tubos y frascos a 35 °C en condiciones apropiadas para el organismo que se cultiva.

Control de calidad del usuario: Véase "Procedimientos de control de calidad".

El control de calidad debe llevarse a cabo conforme a la normativa local y/o nacional, a los requisitos de los organismos de acreditación y a los procedimientos estándar de control de calidad del laboratorio. Se recomienda consultar las instrucciones pertinentes del CLSI y la normativa de la CLIA para obtener información acerca de las prácticas adecuadas de control de calidad.

X. RESULTADOS

El crecimiento en medios de caldo se indica por la presencia de turbidez en comparación con un control sin inocular.

XI. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Los caldos de enriquecimiento no deben utilizarse como único medio de aislamiento. Deben utilizarse en conjunto con medios en placa selectivos y no selectivos para aumentar la probabilidad de aislar patógenos, en especial si pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

Para su identificación, los organismos se deben encontrar en cultivo puro. Deben llevarse a cabo pruebas morfológicas, bioquímicas y/o serológicas para lograr una identificación final. Para más información, consultar los textos correspondientes⁴⁷.

XII. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Antes de su lanzamiento al mercado, todos los lotes de Mueller Hinton Broth se analizan para determinar sus características de rendimiento. Se analizan muestras representativas del lote con suspensiones de células de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, diluidas en solución salina normal hasta una concentración de 10^3 – 10^6 UFC por tubo de caldo. Los tubos se incuban con las tapas flojas a una temperatura de 35 ± 2 °C durante un día en una atmósfera aerobia. Se observa crecimiento con todos los organismos.

XIII. DISPONIBILIDAD

Nº de cat.	Descripción
296164	BBL Mueller Hinton Broth, 2 mL, caja de 100 tubos de tamaño K

XIV. REFERENCIAS

1. Mueller, J.H., and J. Hinton. 1941. A protein-free medium for primary isolation of the gonococcus and meningococcus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 48:330-333.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Approved standard M7-A8. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. CLSI, Wayne, Pa.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Approved standard M2-A10. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 10th ed. CLSI, Wayne, Pa.
4. Washington, J.A. (ed.). 1985. Laboratory procedures in clinical microbiology, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
5. Forbes, B.A., D.F. Sahm, and A.S. Weissfeld. 1998. Bailey & Scott's diagnostic microbiology, 10th ed. Mosby, Inc., St. Louis.
6. Murray, P.R., E.J. Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, and R.H. Tenover (ed.). 1995. Manual of clinical microbiology, 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
7. Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley, and S.T. Williams (ed.). 1994. Bergey's Manual™ of determinative bacteriology, 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

ANEXO B.
CARACTERÍSTICAS CEPA CLÍNICA Y DE ALIMENTOS

RESULTADO MICROBIOLÓGICO

CEPA 1748 Aislamiento positivo para *Escherichia coli*

Sexo de paciente: Femenino.

Tipo de enfermedad: Infección Urinaria

Origen de muestra: (Aislamiento positivo en Sonda vesical y Hemocultivo).

Producción de Biofilm: Alta formadora de Biofilm.

Factores de virulencia Fenotípicos: Productora de Celulosa, Alfa hemolítica.

Clasificación Genotípica: Positivo al gen *uidA*, Pertenece al grupo Filogenético B subgrupo B23.

Factores de virulencia genotípicos: Positivo *fyuA*, *kpsmTII*, *PAI*, *papAH*.

PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTENCIA (Difusión en disco)

Amicacina: **Sensible**

Ampicilina/Sulbactam: **Resistente**

Ampicilina: **Resistente**

Aztreonam: **Resistente**

Cefazolina: **Resistente**

Cefepima: **Resistente**

Cefotaxima: **Resistente**

Cefoxitina: **Resistente**

Ceftazidima: **Resistente**

Ceftriaxona: **Resistente**

Ciprofloxacina: **Resistente**

Doripenem: **Sensible**

Ertapenem: **Sensible**

Gentamicina: **Sensible**

Meropenem: **Sensible**

Nitrofurantoina: **Resistente**

Piperacilina/tazobactam: **Sensible**

Piperacilina: **Resistente**

Tobramicina: **Sensible**

Trimetropim/sulfametaxol: **Resistente**

CEPA 0385 Aislamiento positivo para *Escherichia coli*

Origen de muestra: Alimento Comida rápida (Hamburguesa)

Factores de virulencia Fenotípicos: POR CONFIRMAR

Clasificación Genotípica: Positivo al gen *uidA*.



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-Programa de Biología
Campus San Pablo, Avenida del Consulado, Calle 30 No. 48-152
Grupo de Investigación Microbiología Clínica y Ambiental
Laboratorio Número 110 y 111
Web: Investigaciones.unicartagena.edu.co

ANEXO C

MATERIALES

Microplaca de 96 pozos



ANEXO D

FICHAS TÉCNICA DE EQUIPOS DE LABORATORIO

Espectrofotómetro

FLUOstar® Omega - Technical specifications

Due to the modularity of BMG LABTECH's instruments, all, or combinations of the features below can be installed at purchase or upgraded at any time. Please contact your local representative for more details or a quote.

Detection modes	Fluorescence intensity - including FRET AlphaScreen®/AlphaLISA® Luminescence (flash and glow) - including BRET Time-Resolved Fluorescence - including TR-FRET UV/vis absorbance	
Measurement modes	Top and bottom reading Endpoint and kinetic Sequential multi-excitation Sequential multi-emission Ratiometric measurements Well scanning	
Microplate formats	Up to 384-well plates, 1536-well plates in absorbance, user-definable	
Light source	High energy xenon flash lamp	
Detectors	Side window photomultiplier tube	
Optical filters	Excitation and emission filter wheels for 8 filters each	
Spectral range	240 - 740 nm or 240 - 900 nm Absorbance spectrometer: 220 - 1000 nm	
Sensitivity	FI	< 0.2 fmo/well fluorescein
	TRF	< 30 amol/well europium
	High-end TRF for Omega	< 3 amol/well europium
	LUM	20 amol/well ATP DLReady™ certified
	AlphaScreen®	< 100 amol* (384)
	Abs with spectrometer	Spectral range: 220 - 1000 nm Full spectrum captured in < 1 s/well Selectable spectral resolution: 1 - 10 nm OD range: 0 to 4 OD Accuracy: < 1% at 2 OD Precision: < 0.5% at 1 OD and < 0.8% at 2 OD
Read times	Flying mode: 9 s (96), 16 s (384)	
Reagent injection	Up to 2 built-in reagent injectors Injection at measurement position (6 to 384-well) Individual injection volumes for each well (3 to 500 µL) Variable injection speed up to 420 µL/s Up to four injection events per well Reagent back flushing	
Shaking	Linear, orbital, and double-orbital with user-definable time and speed	
Gas vent	System to inject an atmosphere or to pull a vacuum into the reader	
Incubation	+4°C above ambient up to 45°C or 65°C	
Software	Multi-user software package including Reader Control and MARS data analysis software	
Dimensions	Width: 44 cm, depth: 48 cm, height: 30 cm; weight: 28 kg	
Accessories		
Stacker	Plate handler for up to 50 microplates - continuous loading feature	
THERMOstar	Microplate incubator and shaker	
LVis Plate	Microplate designed to measure 16 low volume (2 µL) samples and standard cuvettes. Incorporating NIST filter and holmium oxide standards for instrument performance test. Sensitivity: 2 ng/µL dsDNA	
Filters	Optimized for dyes, fluorophores and specific assays Filters for all applications from UV to NIR Customized filters available upon request	
Upgrades	Upgrades to include options such as additional detection modes, reagent injectors, extended temperature control, etc. are available. Please contact your local representative for more information.	

AlphaScreen, AlphaLISA as well as LANCE and DELFIA are registered trademarks of PerkinElmer, Inc. DLR is a trademark of Promega Corporation. HTRF is a registered trademark of Cisbio Biosciences. LuminaScreen is a registered trademark of Life Technologies. Transcreeper is a registered trademark of BellBrook Labs.
* Limit of detection < 100 amol of biotinylated and phosphorylated polypeptide (P-Tyr-100 assay kit, PerkinElmer, #6760620C), measured in white 384 small volume microplates (17 µL/well)
Limit of detection was calculated according to the IUPAC standard: $3\sigma(SD_{blank}/slope)$
© 2016 All rights reserved. All logos and trademarks are the property of BMG LABTECH.

Headquarters Germany
BMG LABTECH GmbH
Allmendgrün 8
77799 Ortenberg
Tel. +49 781 96968 -0
germany@bmglabtech.com

Australia
BMG LABTECH Pty. Ltd.
2/24 Carbine Way
Mornington, Victoria, 3931
Tel. +61 3 5973 4744
australia@bmglabtech.com


France
BMG LABTECH SARL
7, Rue Roland Martin
94500 Champigny s/ Marne
Tel. +33 1 48 86 20 20
france@bmglabtech.com

Japan
BMG LABTECH JAPAN Ltd.
1-6-2, Shimo-cho
Omiya-ku
330-0844 Saitama City
Tel. +81 48 647 7217
japan@bmglabtech.com

UK
BMG LABTECH Ltd.
5 Alton House Office Park
Gatehouse Way
Aylesbury
HP19 8XU
Tel. +44 1296 336650
uksales@bmglabtech.com

USA
BMG LABTECH Inc.
13000 Weston Parkway
Suite 109
Cary, NC 27513
Tel. +1 877 264 5227
usa@bmglabtech.com

www.bmglabtech.com

 Made in Germany

11/2016

Horno de Secado

Hoja de especificaciones Modelo FP 53



Modelo FP 53 | Cámaras de calor y de secado Classic.Line con convección forzada y funciones de programa

Las cámaras de prueba de materiales de la serie FP de BINDER garantizan tiempos de secado cortos y un calentamiento especialmente rápido, incluso cuando las cámaras están cargadas completamente.

VENTAJAS

- Temperatura homogénea gracias a la cámara de precalentamiento APT.line™
- Condiciones estables de prueba en el espacio útil, independientemente del tamaño y la cantidad de la muestra
- Su excepcional aislamiento térmico permite reducir los costes operativos
- Amplias opciones de programación



Modelo 53

CARACTERÍSTICAS IMPORTANTES

- Rango de temperatura: desde 5 °C por encima de la temperatura ambiente hasta 300 °C
- Tecnología de cámara de precalentamiento APT.line™
- Velocidad del ventilador ajustable
- Rejilla de aire regulable
- Controlador con programación de períodos y en tiempo real
- 2 rejillas cromadas
- Dispositivo de seguridad de temperatura con ajuste independiente de clase 2 (DIN 12880) y alarma óptica
- Interfaz de ordenador: RS 422

INFORMACIÓN DE PEDIDOS

Volumen interior [L]	Tensión nominal	Modelo	Variante del modelo	N.º de art.
Modelo FP 53				
53	230 V 1~ 50/60 Hz	Estándar	FP053-230V	9010-0163
	120 V 1~ 60 Hz	Estándar	FP053UL-120V	9010-0176

DATOS TÉCNICOS

Descripción	FP063-230V ¹	FP063UL-120V ¹
Número de artículo	9010-0163	9010-0175
Datos técnicos temperatura		
Rango de temperatura 5 °C por encima de la temperatura ambiente hasta [°C]	300	300
Desviación de temperatura ambiente a 160 °C [± K]	2	2
Fluctuación de la temperatura a 160 °C [± K]	0,3	0,3
Tiempo de calentamiento a 160 °C [min]	24	24
Tiempo de recuperación tras 30 s con la puerta abierta a 160 °C [min]	5	5
Datos de intercambio de aire		
Tasa de intercambio de aire a 160 °C [x/h]	64	64
Datos eléctricos		
Tensión nominal [V]	230	120
Frecuencia de red [Hz]	50/60	60
Potencia nominal [kW]	1,2	1,2
Fusible del equipo [A]	10	16
Fase (tensión nominal)	1~	1~
Dimensiones exteriores		
Anchura neto [mm]	636	636
Altura neto [mm]	620	620
Fondo neto [mm]	676	676
Distancia a la pared lateral [mm]	100	100
Distancia a la pared trasera [mm]	160	160
Dimensiones interiores		
Anchura [mm]	400	400
Altura [mm]	400	400
Fondo [mm]	340	340
Dimensiones		
Volumen interior [L]	53	53
Peso neto del equipo (vacío) [kg]	44	44
Carga total máxima [kg]	40	40
Carga máxima por bandeja [kg]	16	16
Datos de relevancia medioambiental		
Consumo energético a 160 °C [Wh/h]	300	300
Estructuras		
Cantidad de bandejas (est./máx.)	2/5	2/5

¹ Todos los datos técnicos son válidos exclusivamente para equipos sin carga con equipamiento estándar a una temperatura ambiente de 22 ± 3 °C y una fluctuación de la tensión de red del ±10%. Los datos de temperatura se han calculado según el estándar de fábrica BINDER y de conformidad con la norma DIN 12880:2007, basándose en las distancias recomendadas a la pared del 10% de la altura, la anchura y el fondo de la cámara interior. Todos los datos corresponden a los valores medios de equipos de serie. Los datos técnicos hacen referencia al 100% de las revoluciones del ventilador. Nos reservamos el derecho a realizar modificaciones técnicas.

DIMENSIONES INCL. COMPONENTES Y CONEXIONES [MM]



Autoclave

Poleax Plus Series -Tabletop Semiauto

The Poleax Plus Series are designed for sterilization of unwrapped materials in hospitals and clinics. They are easy to install – just plug into a power source, add water and start sterilizing. Simple operation and easy maintenance. Comply with EN13060 Class N.

SA-232N/SA-252N/SA-300N


Features:

- Class N
- Digital sterilization cycle recorder (SD & USB)
- Overheat protection
- Pressure overload protection
- Pressure safety valve
- Pressure auto-lock
- Micro switch door lock
- Emergency stop button

Class N Model	SA-232N	SA-252N	SA-300N
Chamber capacity (Liter)	16	24	40
Sterilization Temp (°C)	121 and 134		
Control system	Microprocessor		
Life time	7 years		



SA-232N/SA-252N

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016


AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL LUMIERES




Yo **Francisco Javier Sánchez Pulido** en calidad de titular de la obra **Evaluación de un método de desinfección de agua por láser infrarrojo usando *Escherichia coli* como bioindicador**, elaborada en el año **2016**, autorizo al **Sistema de Bibliotecas de la Fundación Universidad América** para que incluya una copia, indexe y divulgue en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres, la obra mencionada con el fin de facilitar los procesos de visibilidad e impacto de la misma, conforme a los derechos patrimoniales que me corresponde y que incluyen: la reproducción, comunicación pública, distribución al público, transformación, en conformidad con la normatividad vigente sobre derechos de autor y derechos conexos (Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, entre otras).

Al respecto como Autor manifiesto conocer que:

- La autorización es de carácter no exclusiva y limitada, esto implica que la licencia tiene una vigencia, que no es perpetua y que el autor puede publicar o difundir su obra en cualquier otro medio, así como llevar a cabo cualquier tipo de acción sobre el documento.
- La autorización tendrá una vigencia de cinco años a partir del momento de la inclusión de la obra en el repositorio, prorrogable indefinidamente por el tiempo de duración de los derechos patrimoniales del autor y podrá darse por terminada una vez el autor lo manifieste por escrito a la institución, con la salvedad de que la obra es difundida globalmente y cosechada por diferentes buscadores y/o repositorios en Internet, lo que no garantiza que la obra pueda ser retirada de manera inmediata de otros sistemas de información en los que se haya indexado, diferentes al Repositorio Digital Institucional – Lumieres de la Fundación Universidad América.
- La autorización de publicación comprende el formato original de la obra y todos los demás que se requiera, para su publicación en el repositorio. Igualmente, la autorización permite a la institución el cambio de soporte de la obra con fines de preservación (impreso, electrónico, digital, Internet, intranet, o cualquier otro formato conocido o por conocer).
- La autorización es gratuita y se renuncia a recibir cualquier remuneración por los usos de la obra, de acuerdo con la licencia establecida en esta autorización.
- Al firmar esta autorización, se manifiesta que la obra es original y no existe en ella ninguna violación a los derechos de autor de terceros. En caso de que el trabajo haya sido financiado por terceros, el o los autores asumen la responsabilidad del cumplimiento de los acuerdos establecidos sobre los derechos patrimoniales de la obra.
- Frente a cualquier reclamación por terceros, el o los autores serán los responsables. En ningún caso la responsabilidad será asumida por la Fundación Universidad de América.
- Con la autorización, la Universidad puede difundir la obra en índices, buscadores y otros sistemas de información que favorezcan su visibilidad.

Conforme a las condiciones anteriormente expuestas, como autor establezco las siguientes condiciones de uso de mi obra de acuerdo con la **licencia Creative Commons** que se señala a continuación:

 Fundación Universidad de América	FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA	Código:
	PROCESO: GESTIÓN DE BIBLIOTECA	Versión 0
	Autorización para Publicación en el Repositorio Digital Institucional – Lumieres	Julio - 2016

	Atribución- no comercial- sin derivar: permite distribuir, sin fines comerciales, sin obras derivadas, con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial: permite distribuir, crear obras derivadas, sin fines comerciales con reconocimiento del autor.	<input type="checkbox"/>
	Atribución – no comercial – compartir igual: permite distribuir, modificar, crear obras derivadas, sin fines económicos, siempre y cuando las obras derivadas estén licenciadas de la misma forma.	<input checked="" type="checkbox"/>

Licencias completas: http://co.creativecommons.org/?page_id=13

Siempre y cuando se haga alusión de alguna parte o nota del trabajo, se debe tener en cuenta la correspondiente citación bibliográfica para darle crédito al trabajo y a su autor.

De igual forma como autor autorizo la consulta de los medios físicos del presente trabajo de grado así:

AUTORIZO	SI	NO
La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca) del CD-ROM y/o Impreso	X	
La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer para efectos de preservación	X	

Información Confidencial: este Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica o secreta o se ha pedido su confidencialidad por parte del tercero, sobre quien se desarrolló la investigación. En caso afirmativo expresamente indicaré, en carta adjunta, tal situación con el fin de que se respete la restricción de acceso.	SI	NO
		X

Para constancia se firma el presente documento en Bogotá, a los 23 días del mes de agosto del año 2017.

EL AUTOR:

Autor 1

Nombres	Apellidos
Francisco Javier	Sánchez Pulido
Documento de identificación No	Firma
1047450737	